

Evelyn Cristina da Silva Santos

Envolvimento do sistema taquicinérgico em um modelo animal de
transtorno de estresse pós-traumático

Tese submetida ao Programa de Pós Graduação em
Farmacologia da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito parcial para obtenção do título
de Doutor em Farmacologia.

Orientadora Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de
Lima

Coorientador Prof. Dr. Marcelo Duzzioni

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Evelyn Cristina da Silva

Envolvimento do sistema taquicinérgico em um modelo animal de transtorno de estresse pós-traumático / Evelyn Cristina da Silva Santos ; orientadora, Thereza Christina Monteiro de Lima ; coorientador, Marcelo Duzzioni. - Florianópolis, SC, 2015.
150 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. transtorno de estresse pós-traumático. 3. substância P. 4. receptor NK1. 5. derrota social. I. de Lima, Thereza Christina Monteiro. II. Duzzioni, Marcelo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

À família por todo o apoio e incentivo

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima, pela orientação e, sobretudo, pela confiança depositada. Agradeço pela oportunidade, amizade, bem como pelo crescimento pessoal e profissional proporcionado ao longo desses anos.

Ao professor Dr. Marcelo Duzzioni, pela coorientação nesse trabalho e por contribuir com a minha formação.

Aos professores Dra. Elaine Cristina Gavioli, Dr. Marcus Lira Brandão, Dra. Cilene Lino de Oliveira, Dr. Rui Daniel Schröder Prediger, Dr. Jamil Assreuy e Dr. Geison de Souza Izídio, por aceitarem o convite para compor a banca e pela colaboração no aprimoramento desse trabalho.

Ao professor Willian Klein da *NorthWestern University* pela colaboração e por me receber tão prontamente em seu laboratório.

Aos colegas do laboratório de Neurobiologia da *NorthWestern University*, em especial a Kirsten, pelo carinho e por toda a ajuda.

À Renata Cristina Nunes Marchette, pela amizade e colaboração neste trabalho, e todo o apoio que me concedeu durante esses anos.

À Máira Assunção Bicca, pela amizade e todo apoio. Por ter aberto as portas da sua casa em Chicago e ter me recebido para o meu “mini-sanduíche”, além da colaboração incondicional para realização deste trabalho.

A minha família, especialmente aos meus pais Jane e Alan, minha irmã Aline, meu cunhado Éder e sobrinho Lucas, por todo apoio, incentivo e amizade durante esses anos.

Ao meu namorado Daniel, pelo amor, amizade e companheirismo. Por estar ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus sogros, Teresinha e Brani, e aos meus cunhados Aline, Gustavo, Priscila e Matheus, por todo o carinho.

Ao meu amigo Filipe, pela amizade, paciência e apoio tanto pessoal quanto profissional ao longo desses anos.

À querida Claudini, a qual agradeço pela oportunidade e paciência durante minha coorientação durante seu trabalho de conclusão de curso.

Aos meus amigos (antigos e novos) do laboratório de Neurofarmacologia, mais conhecido como LabThê: Alexandre, Ana Paula, Andressa, Claudini, Ezequiel, Felipe, Gilliard, Júlia, Máira, Renata, Pablinny, Rebeca e Vagner. Agradeço a cada um por toda a ajuda e, principalmente, por tornarem os dias de trabalho, mesmo aqueles difíceis e incansáveis, tão alegres.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Farmacologia, que contribuíram para a minha formação científica.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia e demais colegas da pós-graduação.

Ao CNPq e CAPES, pelo suporte financeiro.

A todos que, de alguma maneira, colaboraram para a realização desse trabalho.

E, acima de tudo, a Deus pelas oportunidades e vitórias conquistadas.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos
de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que
parecia impossível.”*

Charles Chaplin

RESUMO

O modelo de derrota social (DS) tem sido considerado um modelo naturalístico de estresse, caracterizado por interações agressivas e imprevisíveis que ajudam a compreender melhor as respostas neurobiológicas ao estresse, consistindo em um importante modelo translacional para o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT). O presente trabalho teve como objetivo a caracterização temporal das respostas comportamentais defensivas do modelo de derrota social e a investigação do papel do sistema taquicinérgico neste contexto. Camundongos C57BL/6 utilizados como animais intrusos ou derrotados, foram inseridos na caixa moradia de um animal residente (camundongos *Swiss*) – dentro de uma caixa metálica a fim de conferir proteção física. Durante as sessões de treino (1, 3 ou 6 h) a caixa metálica foi retirada em períodos aleatórios, permitindo o contato direto entre os animais por 2 min ou 10 ataques. Após as sessões de treino, grupos independentes de animais foram submetidos ao teste de partição (TP) em diferentes tempos após a DS (24 h, 7 ou 30 dias). Os animais controle (CTL) foram submetidos ao mesmo protocolo, porém na ausência do animal residente. Nossos resultados mostraram que sessões de treino com duração de 3h por 3 dias consecutivos e avaliação comportamental 24 h após ao TP promoveram respostas comportamentais defensivas mais evidentes (redução do tempo de aproximação na barreira e aumento do comportamento de avaliação de risco), quando comparadas ao demais tempos. Esse foi, portanto, eleito o tempo de protocolo para avaliação das alterações moleculares e bioquímicas do presente estudo. O estresse social induzido pelo DS promoveu o aumento da imunomarcção de substância P, particularmente ao redor do corpo das células neuronais, em regiões encefálicas como hipocampo (HC) e córtex (CT) que são algumas das mais importantes estruturas envolvidas no TEPT. Em paralelo a este aumento, foi observada ainda uma ativação astrocitária e, em menor intensidade, a ativação/migração de micróglia, culminando com a instalação de um importante processo neuroinflamatório que parece ser fundamental para a manutenção da patologia. Os dados obtidos mostraram ainda que a situação de estresse social promoveu um aumento da expressão de receptores NK1 em células GFAP positivas no HC de animais derrotados (58%) em relação ao grupo CTL (32%). Associado a este evento, a expressão do receptor

NK1 na camada de células neuronais foi reduzida pelo estresse. Foram observadas ainda alterações como a degeneração neuronal e prejuízos na neurogênese nas sub-regiões CA3 e giro denteado do hipocampo. O tratamento com uma única administração do antagonista seletivo não peptídico do receptor NK1 - L-703, 606; 10 mg/kg; i.p. - reduziu as respostas comportamentais defensivas. Além disso, parece reestabelecer a expressão de receptores NK1 nas células astrocitárias (35%), assim como a expressão deste receptor na camada de células neuronais. A intervenção farmacológica realizada neste trabalho promoveu também um aumento na expressão dos marcadores de neurogênese como BDNF e espinofilina, sugerindo um possível efeito benéfico deste antagonista. Além disso, o bloqueio dos receptores NK1 promoveu uma redução nos níveis de corticosterona plasmática e reestabeleceu a expressão de receptores de glicocorticoide no HC e CT dos animais, semelhante ao grupo CTL, que havia sido reduzida após o estresse social. Os dados obtidos indicam a relevância do sistema taquicinérgico na neurobiologia do modelo de derrota social. Em conjunto, os resultados sugerem que a SP parece ser liberada em decorrência do estresse social e induz a degeneração neuronal, possivelmente por ativação de vias neuroinflamatórias específicas. Desta forma, sugerimos que o bloqueio o receptor NK1 possa ser uma abordagem terapêutica atrativa para o TEPT.

Palavra-chave: transtorno de estresse pós-traumático; substância P; derrota social; astrócito, receptor NK1

ABSTRACT

The social defeat model (SD) has been considered a naturalistic model of stress featured by aggressive and unpredictable interactions, and it seems to be an important translational model for the post-traumatic stress disorder (PTSD). The present study aimed to evaluate the temporal defensive behavioral responses in a social defeat model, besides elucidating the role of tachykinin system on this model. C57BL/6 mice were used as intruders (defeated animals) and were inserted into the housing box of a resident animal (Swiss) inside a metal box in order to provide physical protection. During the training sessions (1, 3 or 6 h), the metal box was randomly removed allowing direct contact between the animals, during 2 min or 10 attacks. After the training sessions, independent groups of animals were submitted to the partition test (PT) at different times (24 h, 7 or 30 days). Control group (CTL) underwent the same protocol in the absence of the resident animal. Our results showed that animals submitted to training sessions lasting 3 h for 3 consecutive days with behavioral assessment 24 h after in the PT presented more evident defensive behavioral responses – reduction of time spent in the barrier and increased risk assessment behavior – when compared to other protocol times. Therefore, this was the chosen standard protocol to further evaluate the molecular and biochemical changes in this model. The stress augmented substance P animals submitted to the SDM, particularly, surrounding the neuronal cell bodies in the hippocampus (HC) and cortex (CT), well-known cerebral areas involved in PTSD. Moreover, as increased astroglial activation and less intense microglial activation were observed and they could contribute to a neuroinflammatory process. Overall, these alterations seem to be essential for the maintenance of the neurobiology. Our data also have shown a stress-induced NK1 receptor expression in GFAP positive cells in the HC of defeated animals (58%), associated with reduced NK1 expression in the neuronal cell layer, compared to CTL group (32% of co-localization). In addition, defeated animals presented impaired neurogenesis and neurodegeneration. A single administration of the selective non-peptide NK1 receptor antagonist – L-703, 606; 10 mg/kg; i.p. – reduced the defensive behavioral responses. NK1 receptors antagonism restored the NK1 receptors expression in astrocytic cells (35%), as well as in the neuronal cell layer. NK1 receptor antagonism also increased markers of

neurogenesis, namely, BDNF and spinophilin, suggesting a beneficial effect of this pharmacological intervention. Blockage of NK1 receptors induced in the defeated animals a decreased plasma corticosterone, compared to CTL levels. Moreover it reduced the expression of glucocorticoid receptors in the HC and CT. Data obtained in the present study indicates the relevance of tachykinergic system in the neurobiology of social defeat model. Taken together, our results suggest that social stress induces SP release contributing to neuronal degeneration, possibly by activating specific neuro-inflammatory pathways. Thus, we here propose that NK1 receptor may be an attractive therapeutic target to PTSD treatment.

Keyword: post-traumatic stress disorder; substance P; social defeat; astrocytes, NK1 receptor

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Figura representativa da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA).....	31
Figura 2. Estruturas cerebrais envolvidas no desenvolvimento e manutenção do transtorno de estresse pós-traumático.....	33
Figura 3. Esquema representativo do modelo de derrota social seguido pelo teste de partição.....	46
Figura 4. Esquema representativo do protocolo experimental adaptado para o modelo de derrota social e teste de partição.....	47
Figura 5. Esquema representativo das etapas do teste de realocação de objetos.....	49
Figura 6. Esquema representativo do teste de preferência por sacarose.....	50
Figura 7. Esquema representativo do protocolo experimental adotado no presente estudo.....	62
Figura 8. Avaliação da resposta comportamental defensiva, após um estresse promovido pelo modelo de derrota social, 24 h após a última sessão de estresse.....	64
Figura 9. Avaliação da resposta comportamental defensiva, após um estresse promovido pelo modelo de derrota social, 7 dias após a última sessão de estresse.....	65
Figura 10. Avaliação da resposta comportamental defensiva, após um estresse promovido pelo modelo de derrota social, 30 dias após a última sessão de estresse.....	66
Figura 11. Avaliação da resposta comportamental defensiva, após um estresse promovido pelo modelo de derrota social, 24 h após a última sessão de estresse, na ausência do animal residente.....	68

Figura 12. Avaliação dos comportamentos do tipo ansiedade, depressão e cognitivo, após o estresse promovido pelo modelo de derrota social.....	70
Figura 13. Imunomarcção para substância P (SP) no córtex e hipocampo dos animais, após um estresse de derrota social.....	72
Figura 14. Expressão do receptor NK1 no córtex e hipocampo dos animais, após o estresse de derrota social.....	73
Figura 15. Avaliação da ativação e/ou migração astrocitária no córtex e hipocampo de animais após o estresse de derrota social.....	76
Figura 16. Avaliação da ativação e/ou migração microglial no córtex e hipocampo dos animais após um estresse de derrota social.....	77
Figura 17. Níveis de expressão do receptor NK1 em culturas primárias de astrócitos e micróglia provenientes do córtex de rato.....	78
Figura 18. Envolvimento da SP na imunomarcção para o receptor NK1 e na ativação astrocitária em células de culturas primárias mistas de astrócitos e micróglia provenientes do córtex de rato.....	80
Figura 19. Colocalização da expressão do receptor NK1 e da ativação e/ou migração astrocitária no hipocampo dos animais, após o estresse de derrota social.....	83
Figura 20. Avaliação histoquímica de morte neuronal no córtex e hipocampo dos animais após o estresse de derrota social.....	85
Figura 21. Determinação do efeito do antagonista do receptor NK1 (L-703, 606) sobre a resposta comportamental defensiva dos animais, após um estresse promovido pelo modelo de derrota social.....	87

Figura 22. Representação gráfica (mapa ocupacional) do efeito do antagonista do receptor NK1 (L-703, 606) no tempo de aproximação na barreira durante o teste de partição, após o estresse de derrota social.....	88
Figura 23. Efeito do tratamento com o antagonista do receptor NK1 (L-703, 606) sobre a locomoção dos animais após o estresse de derrota social.....	89
Figura 24. Envolvimento do receptor NK1 na modulação da corticosterona plasmática dos animais após o estresse de derrota social.....	91
Figura 25. Efeito do tratamento com o antagonista do receptor NK1 (L-703, 606) na expressão do receptor de glicocorticoide (GR) no hipocampo e córtex dos animais após o de derrota social.....	93
Figura 26. Envolvimento do receptor NK1 na indução da liberação e/ou produção de BDNF no hipocampo e córtex de animais após o estresse de derrota social.....	95
Figura 27. Envolvimento do receptor NK1 na expressão de espinofilina em sub-regiões do hipocampo após o estresse de derrota social.....	97
Figura 28. Efeito do tratamento com o antagonista do receptor NK1 (L-703, 606) na ativação e/ou migração astrocitária, após um estresse de derrota social.....	99
Figura 29. Efeito do tratamento com o antagonista do receptor NK1 (L-703, 606) na ativação astrocitária e a modulação do sistema taquicinérgico no hipocampo e córtex de animais induzidos pelo estresse de derrota social.....	102
Figura 30. Mecanismo proposto para a participação do sistema taquicinérgico no desencadeamento das alterações neurobiológicas e comportamentais decorrentes do estresse promovido pelo modelo de derrota social.....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios diagnósticos para o transtorno de estresse pós-traumático.....	29
Tabela 2. Descrição dos anticorpos utilizados para a realização das técnicas moleculares.....	60
Tabela 3. Esquema dos diferentes tempos adotados na realização dos protocolos de derrota social para a determinação das respostas comportamentais defensivas.....	63
Tabela 4. Perfil das respostas comportamentais etológicas dos animais submetidos ao modelo de derrota social nos diferentes tempos adotados.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH – *adrenocorticotropic hormone* - hormônio adrenocorticotrófico

APA – Associação Americana de Psiquiatria

BDNF – *brain derived neurotrophic factor* - fator neurotrófico derivado do cérebro

CORT – corticosterona

CRH – *corticotrophin releasing hormone* - hormônio liberador de corticotrofina

CTL – controle

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM – *Dulbecco's modified Eagle's medium* – meio *Eagle* modificado por Dulbecco

DMSO – dimetilsulfóxido

DPAG – *dorsal periaqueductal gray* - substância cinzenta periaqueductal dorsal

DSM – *Diagnostic and Statistic Manual* – Manual de Estatística e Diagnóstico da Associação Psiquiátrica Norte Americana

DT – derrotado

E.P.M. - erro padrão da média

FJB – fluoro-Jade B

FH – formação hipocampal

GD - giro denteado

GFAP – *glial fibrillary acidic protein* - proteína ácida fibrilar

GPCRs – *G protein-coupled receptors* - receptores acoplados a proteína G

GR – *glucocorticoid receptor* - receptor glicocorticóide

HBSS – *Hank's balanced salt solution*

HPA – *hypothalamic-pituitary-adrenal* - eixo hipotálamo – hipófise – adrenal

i.p. – via intraperitoneal

Iba-1 - *ionized calcium binding adaptor molecule 1* – molécula adaptadora da ligação de cálcio ionizado 1

KDa – quilodalton

L 703,606 – antagonista seletivo do receptor NK1

LCE – labirinto em cruz elevado

NaCl – cloreto de sódio

NGS – *normal goat serum* – soro normal de cabra

NK1R – receptor taquicinérgico do tipo 1

PBS – *phosphate buffered solution* - tampão fosfato

PMSF – *phenylmethylsulfonyl fluoride* - fenilmetilsulfonilfluoreto

PVN – *paraventricular nucleus* - núcleo paraventricular

RIPA – *radio immuno precipitation assay buffer* – tampão de precipitação para radioimunoensaio

SDS – *sodium dodecyl sulfate* – dodecil sulfato de sódio

SNC – sistema nervoso central

SP – substância P

TBS – *Tris-buffered saline* – solução salina tamponada com Tris

TEPT – transtorno de estresse pós-traumático

TP – teste de partição

TSC – teste de suspensão pela cauda

VEIC - veículo

1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1 TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO (TEPT)	28
1.2 NEUROBIOLOGIA DO TEPT	30
1.3 MODELO DE DERROTA SOCIAL	34
1.4 SISTEMA TAQUICINÉRGICO.....	36
2. OBJETIVOS.....	41
2.1 OBJETIVO GERAL.....	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	43
3.2 ANIMAIS	43
3.3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO	44
3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS	44
3.4.1 <i>Modelo de derrota social</i>	44
3.4.1.1 Teste de partição	45
3.4.1.2 Adaptações do protocolo experimental	46
3.4.2 <i>Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)</i>	47
3.4.3 <i>Teste da suspensão pela cauda (TSC)</i>	48
3.4.4 <i>Teste de realocação de objetos</i>	48
3.4.5 <i>Teste da preferência por sacarose</i>	49
3.5 OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO	50
3.6. CULTURA ASTROGLIAL PRIMÁRIA DE CÓRTEX DE RATOS	51
3.7 ENSAIOS BIOQUÍMICOS.....	52
3.7.1 <i>Dosagem de corticosterona</i>	52
3.7.2 <i>Histoquímica para Fluoro-Jade B</i>	52
3.7.3 <i>Imunoistoquímica</i>	53
3.7.4 <i>Imunofluorescência</i>	54
3.7.5 <i>Imunocitoquímica</i>	56

3.7.6 <i>Análise por Western blotting</i>	57
3.7.6.1 Preparo do extrato celular total do tecido cerebral e determinação de proteínas	57
3.7.6.2 Preparo do extrato celular total da células gliais cultivadas e determinação de proteínas	58
3.7.6.3 Imunodeteção de proteínas por Western blotting.....	59
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
3.9 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	61
4. RESULTADOS	63
4.1. <i>DECURSO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES NAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS DEFENSIVAS NO TESTE DE PARTIÇÃO APÓS O MODELO DE DERROTA SOCIAL</i>	63
4.2 EVIDÊNCIAS DO ENVOLVIMENTO DA SUBSTÂNCIA P NO ESTRESSE SOCIAL.....	71
4.3 <i>A IMPORTÂNCIA DO SISTEMA TAQUICINÉRGICO NA ATIVAÇÃO ASTROGLIAL NO MODELO DE DERROTA SOCIAL</i>	74
4.4 ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR NK1 NA ATIVAÇÃO ASTROCITÁRIA DECORRENTE DO ESTRESSE SOCIAL	78
4.5 <i>A IMPORTÂNCIA DA SUBSTÂNCIA P PARA A NEUROTOXICIDADE NA DERROTA SOCIAL</i>	84
4.6 <i>BLOQUEIO DA RESPOSTA COMPORTAMENTAL DEFENSIVA NO MODELO DE DERROTA SOCIAL PELO ANTAGONISMO DO RECEPTOR NK1</i>	86
4.7 <i>RELEVÂNCIA DAS ALTERAÇÕES MOLECULARES INDUZIDAS PELO MODELO DE DERROTA SOCIAL E EFEITO BENÉFICO DO ANTAGONISMO DO RECEPTOR NK1</i>	90
4.7.1 <i>Alterações dos níveis de corticosterona e da expressão de GR induzidas pelo estresse social e pelo tratamento com L- 703, 606</i>	90
4.7.2 <i>Marcadores de neurogênese</i>	94
4.7.3 <i>Efeito do tratamento com L-703, 606 sobre a ativação astrocitária e a modulação do sistema taquicinérgico induzidos pelo estresse decorrente do modelo de derrota social</i>	98
5. DISCUSSÃO	103

6. SUMÁRIO DOS RESULTADOS	118
7. CONCLUSÃO.....	120
8. REFERÊNCIAS	122
APÊNDICE A	147
ANEXO A	149
ANEXO B	150

A primeira definição de estresse no campo da saúde foi dada por Hans Selye (1936), na qual o termo “stress” designava a resposta geral e inespecífica do organismo frente a um estímulo estressor. Posteriormente, definições mais refinadas foram apresentadas para o termo estressor e resposta ao estresse, sendo um estressor definido como um estímulo de ameaça à homeostase e a resposta ao estresse uma reação do organismo gerada para reestabelecer a homeostase (KOOLHAAS, 2011). Assim, diante de um estímulo estressor, o organismo reage rapidamente por meio de um mecanismo de defesa conhecido como resposta de “luta ou fuga”, caracterizada por uma cascata de respostas comportamentais, psicológicas e também fisiológicas, como um aumento da atividade do sistema nervoso simpático e um aumento na produção do hormônio cortisol (DE KLOET, JOËLS, HOLLSBOER, 2005).

A resposta ao estresse pode ser distinguida de duas formas: adaptativa (‘eustresse’) ou mal adaptativa (‘distresse’). Na resposta adaptativa, o organismo retoma seu padrão de funcionamento após cessar o estímulo estressante, enquanto que na mal adaptativa, a resposta ao estresse é mantida na ausência do estímulo estressor (PHILLIPS, CARROL, DER, 2015).

O estresse tem sido associado a uma variedade de condições psiquiátricas, como ansiedade e depressão, desempenhando uma forte influência no desenvolvimento e na manutenção destes transtornos (PHILLIPS, CARROL, DER, 2015). Mesmo em algumas doenças neurológicas, como é o caso da esquizofrenia e cuja etiologia não parece estar associada especificamente ao estresse (BRENNER *et al.*, 2011). Por alguma razão essas condições psiquiátricas acometem, especialmente, indivíduos considerados mais vulneráveis ao estresse (STARKMAN *et al.*, 1992; NESTLER, 2002; KOOLHAAS, 2011).

1.1 Transtorno de estresse pós-traumático (TEPT)

Dos transtornos decorrentes do estresse, o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT; do inglês: *post-traumatic stress disorder* - PTSD) vem ganhando destaque nos últimos anos, principalmente após o ocorrido em 11 de setembro de 2001 nos Estados Unidos da América (EUA). Os primeiros sintomas, que passaram mais tarde a compor o quadro clínico do TEPT, foram primeiramente descritos em 1871, sendo observado em um grupo de soldados sintomas como taquicardia, ansiedade, hiperexcitação e falta de ar. Inicialmente, o agrupamento destas manifestações clínicas foi denominado de “síndrome do coração”. Posteriormente, uma sintomatologia similar, porém mais severa, foi descrita durante a I e II Guerra Mundial, onde novamente soldados apresentavam uma série de sintomas como tremor grave, surdez ou cegueira e paralisia, conhecida na época como neurose traumática - terminologia dada pelo neurologista alemão Herman Oppenheim (SCHESTATSKY *et al.*, 2003; JAVIDI & YADOLHAHIE, 2012).

Abram Kardiner descreveu achados clínicos como hipervigilância e sensibilidade frente às ameaças ambientais em pacientes que sofriam de neurose traumática. Incentivado pelos achados clínicos da II Guerra Mundial, Kardiner publicou, em 1941, o livro intitulado “As neuroses traumáticas de guerra”. Esta obra foi considerada por diversos autores como responsável pela definição do TEPT (SCHESTATSKY *et al.*, 2003).

Embora o TEPT tenha recebido muita atenção devido aos veteranos de guerra, esse transtorno psiquiátrico pode ser causado por uma variedade de incidentes traumáticos que inclui desde assalto, estupro, tortura, sequestro, abuso infantil, acidentes, ataques ou desastres naturais, como inundações ou terremotos (BRESLAU *et al.*, 1998; KESSLER *et al.*, 2005).

Estima-se que aproximadamente 90% dos indivíduos são expostos a algum trauma durante a vida, mas somente cerca de 10% desses indivíduos desenvolve o quadro de sintomas do TEPT (KESSLER *et al.*, 2005). A diferença na incidência deve-se principalmente a fatores relacionados à heterogeneidade da população, no que diz respeito à severidade, tipo do trauma e episódio traumático pré-existente (HAUGER *et al.*, 2012). De maneira geral, os fatores ambientais e genéticos contribuem diretamente para o desenvolvimento deste transtorno. Além disso,

pacientes diagnosticados com TETP apresentam com frequência comorbidades com outros distúrbios psiquiátricos como depressão, ansiedade e abuso de álcool (ZATZICK *et al.*, 2012).

A categorização como entidade diagnóstica do TEPT ocorreu somente em 1980, na terceira edição do Manual de Estatística e Diagnóstico da Associação Psiquiátrica Norte Americana (DSM-III), passados 100 anos de sua primeira descrição (APA, 1980). Devido a sua relevância, o TEPT deixou de ser um subtipo de transtorno de ansiedade e passou a ser uma patologia independente na nova edição do DSM-V (APA, 2013). A tabela 1 abaixo descreve alguns critérios, segundo a DSM-V, para o diagnóstico do TEPT.

Tabela 1. Critérios diagnósticos para o transtorno de estresse pós-traumático

Critério	Descrição
Critério A	Vivenciar ou testemunhar o evento traumático. Não se aplica à exposição através da mídia, como a televisão, filmes ou imagens
Critério B Revivência do trauma	Recordações intrusivas do trauma, sonhos angustiantes recorrentes e sofrimento psicológico quando exposto a estímulos relacionados ao trauma.
Critério C Esquiva	Esquiva persistente de estímulos relacionados ao trauma; pensamentos ou sentimentos relacionados com o trauma; lembranças externas relacionadas com o trauma (por exemplo, pessoas, lugares, conversas, atividades, objetos ou situações).
Critério D Alterações negativas da cognição e do humor	Incapacidade de recordar as principais características do evento traumático; emoções persistentes negativas relacionadas com o trauma (por exemplo, medo, horror, raiva, culpa ou vergonha); incapacidade persistente de experimentar emoções positivas.
Critério E Alteração da excitação e reatividade	Hiperexcitação; comportamento irritável ou agressivo; comportamento autodestrutivo ou imprudente; resposta de sobressalto exagerada; problemas na concentração; perturbação do sono.

Adaptado do DSM-V (APA, 2013)

1.2 Neurobiologia do TEPT

O TEPT envolve uma série de alterações neuroendócrinas e comportamentais, que podem ser observadas tanto em humanos quanto em modelos animais (HEIMER & VAN HOESEN, 2006). Essas alterações são dependentes da integração de diferentes sistemas como o sistema nervoso central (SNC), o sistema nervoso autônomo e os sistemas endócrino e imunológico (DHABHAR, 1998; CARRASCO & VAN DE KAR, 2003). O SNC controla a resposta ao estresse por meio de diferentes circuitos neurais interligados que incluem o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA; do inglês *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*), o sistema nervoso simpático e o sistema límbico.

A resposta endócrina tem origem no hipotálamo, mais precisamente no núcleo paraventricular (PVN), que recebe estímulos neurais associados ao estímulo estressor e está intimamente relacionado com o controle central da liberação de glicocorticóides. Desta forma, o PVN secreta o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) que medeia a resposta adrenérgica ('fuga e luta' ou congelamento). Além disso, o CRH atua sobre a hipófise anterior estimulando a produção e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que é transportado pela corrente sanguínea até o córtex da adrenal, onde estimula a liberação de glicocorticóides (PHILLIPS *et al.*, 2006). Esta cascata de eventos é conhecida como ativação do eixo HPA e é considerada um dos principais indicadores do estresse (Figura 1).

Os glicocorticóides liberados pela adrenal como consequência do estímulo estressor atuam sobre dois tipos de receptores: os mineralocorticóides (MR) e os glicocorticóides (GR). A ativação de GR é mais predominante na presença de níveis elevados de glicocorticóides como, por exemplo, em resposta ao estresse. E, como mostrado na Figura 1, através de um mecanismo de retroalimentação negativa, a ativação dos GR modula a liberação dos glicocorticóides no intuito de diminuir a síntese e liberação de CRH e ACTH e, conseqüentemente, finalizar a resposta ao estresse (PHILLIPS *et al.*, 2006). Yehuda e colaboradores (2007) avaliaram o nível de cortisol em pacientes que desenvolveram TEPT, ou tiveram o estado da doença inalterado dentro do período de estudo, e observaram nesses pacientes níveis de cortisol reduzidos, quando comparados com pacientes que apresentaram um quadro clínico de

remissão do transtorno. Por outro lado, estudos pré-clínicos têm observado que diferentes tipos de estresse em roedores, como estresse por imobilização, choque nas patas ou privação materna, promovem um aumento no nível de corticosterona sanguínea (MARIN, CRUZ, PLANETA, 2007; RABASA *et al.*, 2011; BROWNE *et al.*, 2014).

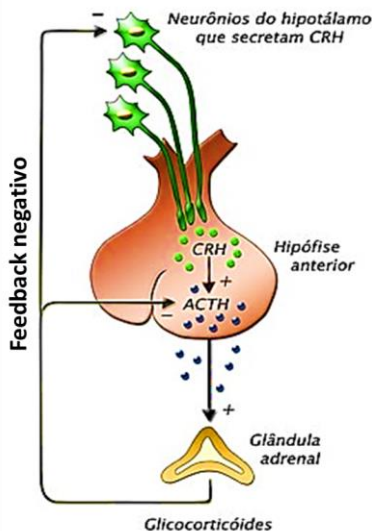


Figura 1. Figura representativa da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Na presença de um estímulo estressor ocorre um aumento na liberação do fator liberador de corticotrofina (CRH) pelo núcleo paraventricular do hipotálamo, que atua sobre a hipófise anterior estimulando a síntese e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que é transportado pela corrente sanguínea até o córtex da adrenal, onde estimula a liberação de glicocorticóides. O mecanismo de retroalimentação ou *feedback* negativo se dá através da ativação dos receptores de glicocorticóides presentes no hipotálamo e hipófise, levando a diminuição da síntese e liberação de CRH e ACTH.

Nas últimas décadas, técnicas de neuroimagem, como a imagem de ressonância magnética (MRI, do inglês *Magnetic Resonance Imaging*) e a tomografia de emissão de pósitrons (PET, do inglês, *Positron Emission Tomography*), têm sido cruciais para identificar estruturas cerebrais importantes na fisiopatologia do

TEPT, bem como eventos neuroquímicos envolvidos neste processo. Neste sentido, estudos em pacientes diagnosticados com TEPT mostraram alterações em três principais estruturas cerebrais: a amígdala, o córtex pré-frontal medial e a formação hipocampal (Figura 2). Ainda, alterações nessas estruturas também são observadas em animais de laboratório após a submissão dos mesmos a modelos de estresse (para revisão HEIMER & VAN HOESSEN, 2006).

No TEPT, o comprometimento do hipocampo está relacionado a uma redução do volume desta estrutura, sendo essa redução associada à severidade do trauma e aos prejuízos da memória (SHIN, RAUCH, PITMAN, 2006). Além da participação no controle das respostas ao estresse, o hipocampo desempenha importante função na memória relacionada ao medo (FANSELOW & DONG, 2010; ALMADA *et al.*, 2013), sendo ainda uma região fundamental para a plasticidade sináptica (BRUEL-JUNGERMAN, RAMPON, LAROCHE, 2007). Uma exposição prolongada ao estresse, com consequente nível elevado de glicocorticoides, pode levar a danos no hipocampo, expressos como redução dendrítica, perda de sinapses e prejuízos na neurogênese (YU *et al.*, 2004; CZECH *et al.*, 2005).

Conexões entre o hipocampo e a amígdala, estrutura límbica envolvida no processamento emocional e na aquisição da resposta ao medo, estão implicadas no condicionamento ao contexto (PROTOPODESCU *et al.*, 2005). A amígdala atua na sinalização da produção de hormônios do estresse e na resposta comportamental através de projeções neuronais que se estendem do núcleo central da amígdala e inervam estruturas como o tronco encefálico, hipotálamo e áreas corticais. As projeções do córtex pré-frontal que inervam a amígdala são na maioria inibitórias como, por exemplo, GABAérgicas e modulam a responsividade ao estresse e medeiam a extinção da memória de medo, uma vez que o córtex pré-frontal exerce controle inibitório sobre a amígdala (MCDUGALL, WIDDOP, LAWRENCE, 2004). Alguns estudos mostram uma redução do volume e hipoatividade do córtex pré-frontal que compreende o córtex cingulado anterior, o córtex subcaloso e o giro frontal medial. O prejuízo estrutural e funcional do córtex pré-frontal medial leva à perda do controle inibitório sobre a amígdala tornando essa estrutura hiperativada (BROWN & MOREY, 2012).

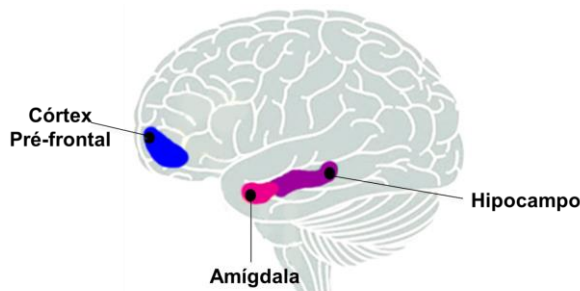


Figura 2. Estruturas cerebrais envolvidas no desenvolvimento e manutenção do transtorno de estresse pós-traumático

Estudos clínicos recentes têm investigado as possíveis alterações presentes em pacientes que não são combatentes militares e que apresentam diagnóstico para TEPT como, por exemplo, vítimas de estupro, abuso infantil e acometidas por desastres naturais (WALSH *et al.*, 2013; LOPES *et al.*, 2014). Por outro lado, vários grupos de pesquisa estão realizando um número cada vez maior de estudos sobre as bases neurobiológicas do TEPT em animais de experimentação, na tentativa de suprir a precariedade ou a deficiência dos modelos animais para o estudo do TEPT atualmente disponíveis (GOSWAMI *et al.*, 2013). Nos últimos anos, é crescente o interesse na pesquisa sobre o TEPT e no desenvolvimento de modelos experimentais para este transtorno, com o objetivo de compreender melhor os mecanismos subjacentes à susceptibilidade e à resiliência ao TEPT, bem como, a pesquisa de possíveis alvos para seu tratamento e/ou prevenção. Entre alguns dos modelos experimentais propostos para o TEPT, as interações sociais vêm ganhando importância, por representarem uma característica inerente a todas as espécies mamíferas (GOLDEN *et al.*, 2011). Estudos recentes têm focado no desenvolvimento e uso de paradigmas de estresse social devido ao grande valor translacional (COHEN *et al.* 2012).

1.3 Modelo de derrota social

Diversos modelos animais têm se mostrado promissores em promover sintomas e características moleculares do TEPT, sejam aqueles considerados preditivos, como imobilização, nado forçado e separação maternal, ou aqueles específicos para o TEPT, como o choque inescapável, baseado no comportamento operante Pavloviano (LIBERZON, KHAN, YOUNG, 2005).

Para serem considerados modelos animais do TEPT os protocolos experimentais e testes comportamentais utilizados devem atender aos três critérios de validade: validade analógica (os modelos devem apresentar semelhanças com sinais ou sintomas do transtorno), validade teórica (o quanto o modelo reproduz as características neurobiológicas do transtorno) e validade preditiva (capacidade de prever efeitos de drogas na clínica, ou seja, deve responder aos fármacos utilizados na clínica (FRIES & MAGALHÃES, 2010).

A principal etiologia do TEPT se baseia na exposição a uma experiência estressante ou traumática, sendo essa característica inserida na construção dos modelos animais para o estudo deste transtorno (COHEN *et al.*, 2012). Entre os fatores estressantes amplamente utilizados no estudo do TEPT destacam-se o odor do predador (DO MONTE *et al.*, 2008), a exposição ao predador (ADAMEC, WALLING, BURTON, 2004) e o choque inescapável (OLSON *et al.*, 2011). Embora esses modelos sejam comumente utilizados para o estudo do TEPT, todos apresentam limitações como, por exemplo, o do odor do predador, devido ao uso de diferentes tipos de gatos e ainda variações no odor sintético. O modelo de choque inescapável nas patas gera apenas uma resposta: a imobilidade, que é avaliada como a retenção da memória emocional condicionada (BERARDI *et al.*, 2014). Portanto, esses modelos não representam proximidade com a vida real, quando contrastados com modelos que envolvem estressores sociais ou psicológicos, como o modelo de conflito social (SAKAI & TAMASHIRO, 2005), tendo em vista que a principal fonte de estresse em humanos é de origem social (BROWN & HARRIS, 1989; SAKAI & TAMASHIRO, 2005).

Devido ao seu importante valor de translação, o interesse no uso de modelos animais que envolvem estressores de origem social tem aumentado (COHEN *et al.*, 2012; GOSWAMI *et*

al., 2013). Nesse sentido, o contexto social tem se mostrado mais apropriado por representar situações similares às observadas em humanos (MARTINEZ, CALVO-TORRENT, HERBERT, 2002) que podem ocorrer ao longo da vida como, por exemplo, o assédio e o *bullying* (BJÖRKQVIST, 2001).

O modelo de estresse por derrota social é considerado um modelo naturalístico de estresse, caracterizado por interações agressivas e imprevisíveis entre animais da mesma espécie (KUDRYAVTSEVA, 1991; MCLAUGHLIN *et al.*, 2006). Este modelo consiste em introduzir um animal intruso na caixa moradia de um animal residente não familiar. Uma vez que o estresse social reside no comportamento agressivo do animal dominante (residente), são necessárias interações diárias entre o animal dominante e o animal intruso (KUDRYAVTSEVA, 1991). As interações que promovem a situação de estresse podem variar na duração, podendo ser classificadas como agudas ou crônicas, e ainda diferir em sessões de derrotas intermitentes ou repetidas. Ademais, podem ser diferenciadas em relação ao tipo de estresse, com o animal intruso sofrendo somente ataques físicos ou com o animal intruso sofrendo além dos ataques físicos, também ameaças de ataques (MARTINEZ, CALVO-TORRENT, HERBERT, 2002).

As alterações comportamentais decorrentes do estresse da derrota social têm sido demonstradas em várias espécies animais, incluindo ratos (BLANCHARD *et al.*, 1995; BUWALDA *et al.*, 2005; KOOLHAAS *et al.*, 2011) e camundongos (BARTOLOMUCCI, 2007). A derrota social é um forte fator estressante no gênero masculino, com grande impacto comportamental, aumentando o comportamento defensivo dentro ou fora da situação de estresse e, ainda, promovendo alterações neuroendócrinas e morfológicas duradouras (BLANCHARD *et al.*, 1995). Além do gênero, o sucesso da situação de estresse varia conforme a espécie e a idade dos animais experimentais (BLANCHARD, MCKITTRICK, BLANCHARD, 2001).

Em estudos de estresse social agudo são observadas alterações comportamentais de longo prazo no padrão de comportamento social, *e.g.*, comportamento subordinado, diminuição do comportamento social (agressão ou acasalamento) e inibição do comportamento territorial, como a incapacidade de produzir odor de marcação territorial (urina) ou de defender seu território em suas caixas-moradia (BLANCHARD *et al.*, 1995; LUMLEY *et al.*, 1999; SIEGFRIED, FRISCHKNECHT, WASER, 1984). São ainda

observados, alterações no padrão de comportamentos não sociais, como aumento da ansiedade e do consumo de álcool (ROGDERS & COLE, 1993; KUDRYAVTSEVA *et al.*, 1991).

Além dessas alterações no padrão de comportamento social e não social, são observadas mudanças neuroendócrinas nos camundongos intrusos expostos repetidamente na caixa moradia de um camundongo residente, como aumento na ativação do eixo HPA, incluindo o aumento dos níveis de corticosterona e de ACTH (HUHMAN *et al.*, 1990; BLANCHARD *et al.*, 1995), perda de peso, hipertermia e mudanças no ritmo circadiano (TORNATZKY & MICZEK, 1993). Sendo assim, a compreensão de como o organismo responde ao modelo de derrota social repetido em animais pode ser útil na elucidação dos efeitos da exposição a um evento traumático em humanos (MCLAUGHLIN *et al.*, 2006).

Ademais, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina, a principal classe de medicamentos utilizada no tratamento de TEPT em humanos (BARLOW & DURAND, 2008; *National Center for PTSD, Understanding PTSD*), tem se mostrado eficaz em reduzir a expressão de comportamentos defensivos causados por diferentes protocolos de derrota social (BERTON *et al.*, 1999; BEITIA *et al.*, 2005). Ainda, a venlafaxina, um inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina, apresentou efeitos do tipo ansiolítico e antidepressivo após a exposição a um protocolo de 10 dias de derrota social (VENZALA *et al.*, 2012), demonstrando assim a validade preditiva dos modelos que envolvem conflito social e seu potencial na triagem de novas abordagens terapêuticas para o TEPT.

1.4 Sistema taquicinérgico

Os neuropeptídeos são pequenas moléculas constituídas por 2 a 100 aminoácidos que atuam modulando neurotransmissão sináptica. Estes estão envolvidos em diversas funções basais no organismo como, por exemplo, a modulação da ansiedade pela colecistoquinina e pelo neuropeptídeo S (DAUGÉ & LÉNA, 1998; VITALE *ET AL.*, 2008; DONNER *et al.*, 2010; KORMOS & GASZNER, 2013). Em consequência desse envolvimento, a

desregulação desses e de outros neuropeptídeos pode ser observada em muitas doenças neuropsiquiátricas (CARRASCO & VAN DE KAR, 2003; ALLDREDGE, 2010).

Os neuropeptídeos podem regular, de forma sutil, a resposta fisiológica basal, sendo as alterações de maior impacto observadas quando as condições estressantes são mais intensas. Desta forma, manipulações farmacológicas na ação dos neuropeptídeos podem ajudar a reestabelecer as condições basais do organismo como, por exemplo, o controle da resposta ao estresse através de manipulações nos níveis de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e de neuropeptídeo Y (NPY) (GRIEBEL, 1999; HOLMES *et al.*, 2003).

Nas últimas décadas tem sido crescente o número de investigações acerca dos neuropeptídeos como uma nova abordagem terapêutica para os distúrbios psiquiátricos (PANKSEPP *et al.*, 2007). Isso se deve a uma característica comum aos neuropeptídeos quanto a sua localização neuroanatômica próxima a importantes neurotransmissores, como as monoaminas e o ácido gama aminobutírico (GABA), ou até mesmo a colocação com estes neurotransmissores no mesmo neurônio, atuando no ajuste fino da ação dos mesmos (HOLMES *et al.*, 2003).

Dentro deste contexto, a substância P (SP) é um neuropeptídeo pertencente à família das taquicininas, composto por uma sequência de 11 aminoácidos (*H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂*) (CHANG; LEEMAN; NIALVER, 1971; OTSUKA & YOSHIOKA, 1993). A SP foi isolada pela primeira vez por Von Euler e Gaddum na década de 1930 a partir do extrato bruto do cérebro e intestino de cavalos e apresentou uma potente atividade hipotensora e de contração do músculo liso (LEEMAN & FERGUSON, 2000) e tem sido um dos neuropeptídeos mais estudados desde sua descoberta (HOLMES *et al.*, 2003).

A SP, juntamente com outras taquicininas, é produzida a partir de proteínas precursoras denominadas pré-pró-taquicininas, codificadas pelo gene codificador da pré-pró-taquicinina-A (PPT-A) e o gene codificador pré-pró-taquicinina-B (PPT-B) (GUARD & WATSON, 1991; HARRISON & GEPPETTI, 2001). O processo de síntese da SP ocorre nos ribossomos do corpo celular e, em seguida, suas moléculas são armazenadas em vesículas sinápticas e transportadas axonalmente para o terminal nervoso onde aguardam o estímulo apropriado para a sua liberação, sendo essa etapa dependente de cálcio (HARRISON & GEPPETTI, 2001;

OTSUKA & YOSHIOKA, 1993). Os efeitos biológicos da SP são mediados pela interação com três diferentes receptores acoplados a proteína G (GPCRs), denominados receptores de neuroquinina ou NK-1, -2 e -3, que são amplamente expressos no SNC sendo que este neuropeptídeo se liga preferencialmente ao receptor NK1 (NK1>NK2>NK3).

O receptor NK1 é expresso tanto em neurônios quanto em células da glia (LAZARCZYK *et al.*, 2007). A distribuição dos receptores NK1 no SNC de mamíferos tem sido investigada por diferentes técnicas como hibridização *in situ*, imunohistoquímica e radioautografia. No SNC de roedores o receptor NK1 está localizado de maneira moderada a intensa em estruturas encefálicas como o estriado, núcleo entopeduncular, núcleo *accumbens*, núcleo amigdalóide medial, giro denteado, habínula, núcleo lateral do hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal dorsal (DPAG), núcleo da rafe, *locus coeruleus*, núcleo do trato solitário e tronco cerebral. A distribuição destes receptores em várias estruturas do sistema límbico sugere um papel importante no controle das emoções, aprendizagem e memória, atenção e regulação autonômica (NAKAYA *et al.*, 1994; GRIEBEL & HOLLSBOER, 2012). Por outro lado, a distribuição dos receptores NK2 ocorre principalmente em alguns núcleos talâmicos, hipocampo e camadas corticais (SAFFROY *et al.*, 2001), enquanto o receptor NK3 se localiza com maior intensidade no bulbo olfatório, córtex cingulado, hipocampo, amígdala, núcleo do leito da estria terminal, áreas hipotalâmicas dorsal e lateral, área tegmental ventral, *locus coeruleus*, núcleo do trato solitário e núcleo motor dorsal do vago (GRIEBEL & HOLLSBOER, 2012).

A substância P é amplamente expressa no SNC. A distribuição deste neuropeptídeo em regiões encefálicas envolvidas no processo emocional (como núcleo *accumbens*, septo e amígdala), assim como na medula espinhal, evidencia a sua participação na etiologia de diversas patologias, tais como nas doenças neurodegenerativas, nos distúrbios psicóticos, nos distúrbios psíquicos como a ansiedade e depressão (para revisão ver RAFFA, 1998; MUÑOZ & COVEÑAS, 2014).

As taquicinas produzidas nas células neuronais e da glia, no sistema nervoso central e no sistema periférico (LAZARCZYK *et al.*, 2007), estão envolvidas em uma variedade de respostas como no processamento da dor e inflamação (BENOLIEL *et al.*, 1999; TEODORO *et al.*, 2013), nas respostas

cardiovasculares e respiratórias (TSCHÖPE *et al.*, 1995; BAUMAN *et al.*, 2002) e na resposta imune (EVANS *et al.*, 2008). A ligação da SP ao receptor NK1 induz a fosforilação de proteínas quinase C, que ativa uma cascata intracelular de sinalização, que culmina na translocação do NF- κ B, facilitando a síntese de citocinas pró-inflamatórias (KOON & POTHOUKAKIS, 2006). A interação da SP com o receptor NK1 atua, ainda, na modulação da liberação de CRH, ACTH e corticosterona uma vez que é amplamente expressa no eixo HPA (MALENDOWICZ & MARKOWSKA, 1994; JESSOP, 1999). Além disso, uma regulação direta do eixo HPA é provável devido à localização dos receptores NK1 no PVN (CARRASCO & VAN DE KAR, 2003).

Diferentes estudos comportamentais, incluindo trabalhos do nosso grupo de pesquisa, sugerem o envolvimento da ativação do receptor NK1 pela SP nos comportamentos relacionados ao medo e à ansiedade e na resposta ao estresse (GAVIOLI *et al.*, 1999; RUPNIAK *et al.*, 2001; EBNER *et al.*, 2004; TEIXEIRA, DUARTE, DE LIMA, 2004; DUZZIONI *et al.*, 2008; EBNER *et al.*, 2008; MICHELSON *et al.*, 2013). Teixeira e colaboradores (1996) mostraram que a ativação dos receptores NK1, e também NK2, promove um efeito do tipo ansiogênico em camundongos quando avaliados no teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Fortalecendo os achados na pesquisa com animais, estudos clínicos demonstraram que o conteúdo de substância P está aumentado no líquido cefalorraquidiano de pacientes diagnosticados com TEPT (GERACIOTI *et al.*, 2006; MATHEW *et al.*, 2011).

Além disso, em diversos modelos animais, o antagonismo dos receptores NK1 tem mostrado um efeito do tipo-ansiolítico (TEIXEIRA *et al.*, 1996; RUPNIAK *et al.*, 2000; VARTY *et al.*, 2002) e na inibição da resposta de medo (BROIZ *et al.*, 2012). O bloqueio destes receptores através da administração do FK-888, um antagonista peptídico do receptor NK1, produz uma resposta do tipo ansiolítica em camundongos quando avaliados no labirinto em cruz elevado (TEIXEIRA *et al.*, 1996). Efeitos comportamentais similares foram observados em outros testes comportamentais (utilizando o GR205171 – antagonista não peptídico NK1 -; RUPNIAK *et al.*, 2000; RUPNIAK *et al.*, 2001), evidenciando que o bloqueio do receptor NK1 reduz as respostas relacionadas com medo e ansiedade. Além disso, a deleção genética desses receptores (NK1-/-) reduz a vocalização induzida pela separação materna em camundongos e em cobaias e comportamentos relacionados à

ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado (RUPNIAK *et al.*, 2001; SANTARELLI *et al.*, 2003).

Adicionalmente, Berton e colaboradores (2006) mostraram que a inibição da liberação da substância P, especificamente no núcleo *accumbens* através do bloqueio de receptores NK₁, parece mimetizar a resiliência em animais, sugerindo que o antagonismo dos receptores NK₁ possa ser útil como ferramenta farmacológica para promover resiliência em humanos (FEDER, NESTLER, CHARNEY, 2009).

2.1 Objetivo geral

Investigar o envolvimento do sistema taquicinérgico nas alterações comportamentais e moleculares em um modelo animal de estresse, a derrota social.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar as respostas comportamentais defensivas, bem como as possíveis alterações comportamentais em testes preditivos de ansiedade, depressão, comportamento anedônico e prejuízo de memória, decorrentes do estresse promovido pelo modelo de derrota social;
- Avaliar o efeito do estresse induzido pelo modelo de derrota social sobre a modulação do sistema taquicinérgico, ativação e/ou migração de células gliais e degeneração neuronal, no córtex e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo em estudo;
- Avaliar o efeito do tratamento com L-703, 606, um antagonista seletivo não peptídico do receptor NK1, sobre as alterações comportamentais, moleculares e bioquímicas pelo modelo de derrota social em camundongos;
- Verificar o efeito do estresse induzido pelo modelo de derrota social sobre os marcadores de neurogênese no hipocampo dos animais e o efeito do tratamento com L-703, 606 sobre este processo;
- Avaliar o efeito do estresse induzido pelo modelo de derrota social sobre os níveis de corticosterona plasmática e a expressão de GR no córtex e hipocampo, e o efeito do tratamento com L-703, 606 sobre as possíveis alterações;

3.1 Considerações éticas

Todos os experimentos foram conduzidos conforme os padrões internacionais do bem-estar animal e recomendados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (CONCEA) e Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC). Os procedimentos experimentais envolvidos neste estudo foram realizados de maneira a minimizar o sofrimento dos animais. Além disso, foi utilizado um tamanho de amostras mínimo e adequado para as análises estatísticas e extraído o máximo de informações relevantes possíveis para o cumprimento dos objetivos propostos. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com a recomendação da Lei brasileira (#11.794—08/10/2008), que regulamenta pesquisas com animais no Brasil, e previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) sob o número P00545 (Anexo A).

3.2 Animais

Os protocolos experimentais foram realizados utilizando camundongos machos da linhagem C57BL/6 (3- 4 meses; peso 25-30 g) como animais intrusos e camundongos machos da linhagem *Swiss* (5- 8 meses; peso 40-50 g) como animais residentes. Os camundongos C57BL/6 foram adquiridos inicialmente da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), sendo posteriormente realizada a criação e manutenção da colônia no Laboratório de Neurofarmacologia, Departamento de Farmacologia, UFSC. Os camundongos *Swiss* machos eram provenientes do Biotério Central da UFSC e mantidos durante a realização dos experimentos no biotério setorial do Laboratório de Neurofarmacologia. Os animais intrusos foram isolados 1 semana antes do início dos experimentos e mantidos separados dos animais residentes. Todos os animais foram discriminados por sexo e mantidos em estantes ventiladas

(Alesco®; Monte Mor, SP, Brasil) sob temperatura constante ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo claro/escuro 12/12 h, com luzes acendendo às 7 h. Os animais tiveram livre acesso à água e ração, exceto durante os protocolos experimentais que foram realizados entre as 12 e as 18 h.

3.3 Tratamento farmacológico

Com a finalidade de avaliar o efeito do bloqueio dos receptores NK1 nas respostas comportamentais defensivas induzidas pelo estresse, promovido pelo modelo de derrota social, os animais C57BL/6 (intrusos) - após a realização do protocolo experimental foram denominados derrotados (DT) - foram tratados com o antagonista não peptídico seletivo para o receptor NK1 (L-703, 606; Sigma- Aldrich; St. Louis, MO, EUA). Diferentes doses do antagonista (1, 3 e 10 mg/kg) foram administradas por via intraperitoneal 30 min antes da exposição dos animais ao teste de partição (TP) para avaliação das respostas comportamentais defensivas. As concentrações do antagonista foram escolhidas com base em estudos prévios (HALASZ *et al.*, 2008; ROBINSON *et al.*, 2012). Os animais do grupo controle foram tratados por via intraperitoneal com o veículo (DMSO 10% em salina).

3.4 Testes comportamentais

3.4.1 Modelo de derrota social

O modelo de derrota social fundamenta-se em um paradigma residente-intruso. Para a realização deste protocolo e padronização do modelo de derrota social, os animais residentes foram isolados por um período de um mês em sua caixa moradia, a fim de induzir agressividade. Uma semana antes do início do protocolo experimental, isto é, das sessões de treino, os animais intrusos foram isolados por um período de 5 - 7 dias, com o intuito de eliminar a hierarquia entre os animais. Os animais intrusos foram expostos ao animal residente, em sua caixa moradia, por três dias consecutivos em três diferentes tempos: 1, 3 e 6 h, que consistiram nas sessões de treino. Durante os 3 dias consecutivos do protocolo, cada animal intruso foi colocado dentro de uma caixa metálica (19 x

15 x 8 cm) perfurada sendo essa caixa então inserida na caixa moradia do animal residente (41 x 34 x 16 cm). A caixa metálica confere ao animal experimental proteção física, mas permite contato sensorial (visual e olfatório) com o animal residente. Durante as sessões de treino, em horários aleatórios, a caixa metálica foi removida, permitindo o contato direto entre o animal intruso e o animal residente durante o tempo máximo de 2 min ou no máximo 10 ataques diretos do residente ao intruso. Foram utilizados grupos independentes de animais para cada tempo de treino avaliado. Um grupo de animais exposto a um contexto neutro semelhante, ou seja, uma caixa moradia contendo apenas serragem limpa, foi adicionado em todos os tempos de análise como grupo controle.

3.4.1.1 Teste de partição

O teste de partição descrito detalhadamente por Kudryavtseva (1994) foi adaptado para o presente estudo. Neste estudo, para a caracterização das respostas comportamentais defensivas mais adequadas foram realizados protocolos com três diferentes tempos de avaliação no teste de partição: 24 h, 7 ou 30 dias após a última sessão treino. A Figura 3 mostra esquematicamente as etapas do modelo de derrota social seguido pelo teste de partição. Durante o teste, o animal intruso foi exposto ao animal residente em sua caixa moradia, porém separados por uma barreira física. A barreira consiste em uma placa de material acrílico perfurado e transparente, que permite contato sensorial, mas impede o contato físico entre os animais. O grupo controle foi exposto ao teste de partição na ausência do animal residente. Os comportamentos defensivos avaliados foram: tempo de aproximação na barreira, avaliação de risco (ou estiramento corporal direcionado à barreira), número de levantamentos, autolimpeza e a escavação da serragem. A sessão de teste teve duração de 5 min e foi registrada com o auxílio de uma câmera de vídeo para posterior análise.

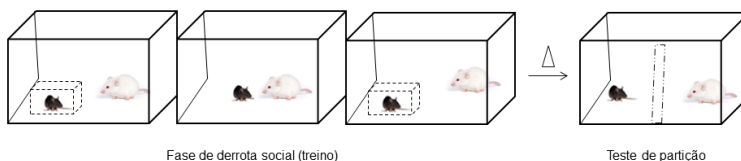


Figura 3. Esquema representativo do modelo de derrota social seguido pelo teste de partição. As linhas cheias representam a caixa moradia do animal residente e a as linhas pontilhadas a caixa metálica na qual o animal intruso é inserido dentro da caixa do animal residente, durante as sessões de treino. A segunda caixa (da esquerda para a direita) representa o momento durante o treino em que a caixa metálica é retirada, permitindo o contato entre os animais durante 2 min ou 10 ataques físicos. Após as repetições da sessão treino durante os tempos estipulados os animais foram expostos ao teste de partição – última caixa (da esquerda para a direita) no qual as linhas pontilhadas representam a barreira física entre os animais. O delta (Δ) representa os diferentes tempos em que o animal intruso foi exposto ao animal residente no teste de partição (24 h, 7 ou 30 dias).

3.4.1.2 Adaptações do protocolo experimental

Com o objetivo de validar o protocolo experimental adotado para o modelo de derrota social, foram realizadas duas adaptações deste protocolo e avaliadas as possíveis alterações nas respostas comportamentais defensivas. A Figura 4A demonstra esquematicamente o primeiro protocolo experimental adaptado, que consiste em sessões de treino modificadas e avaliação através do mesmo teste de partição descrito no item 3.4.1.1. O animal intruso ($CTL\alpha$) foi exposto a uma caixa neutra, na ausência do animal residente. As sessões de treino foram seguidas pelo teste de partição, 24 h após a última sessão de treino, no qual o animal intruso foi exposto ao animal residente em sua caixa moradia – separados por uma barreira física – e as respostas comportamentais defensivas foram avaliadas, como descrito anteriormente. O segundo protocolo experimental adaptado foi realizado como demonstrado na Figura 4B. Neste protocolo, durante as sessões de treino o animal intruso ($DT\beta$) foi exposto ao animal residente em sua caixa moradia, como descrito anteriormente no item 3.4.1.1. As sessões de treino foram então seguidas pelo teste de partição adaptado, 24 h após a última sessão de treino, no qual o animal

intruso foi exposto a caixa moradia do animal residente, na ausência deste, e as respostas comportamentais defensivas foram avaliadas, como descrito anteriormente.

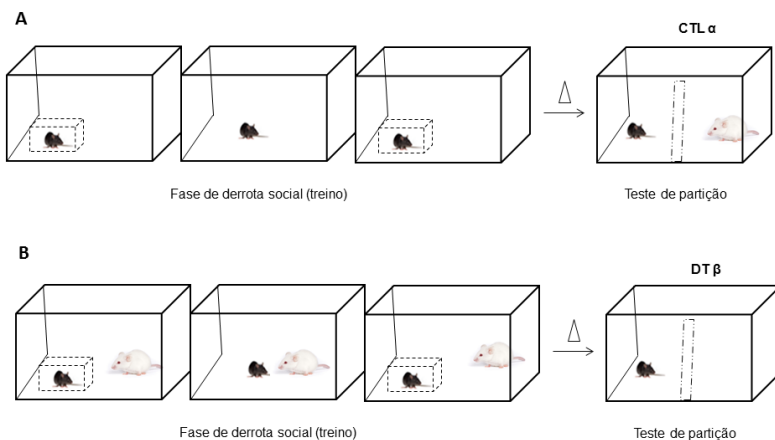


Figura 4. Esquema representativo do protocolo experimental adaptado para o modelo de derrota social e teste de partição. (A) Representação gráfica da alteração do protocolo experimental no qual o animal intruso (CTL α) foi submetido à sessão de treino na ausência do animal residente, porém é exposto ao teste de partição na presença deste. (B) Condição experimental adaptada na qual o animal intruso (DT β) que foi exposto à sessão de treino na presença do animal residente, mas foi submetido ao teste de partição na ausência deste.

3.4.2 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

O comportamento do tipo ansiedade do animal intruso foi avaliado usando o teste do LCE (LISTER, 1987). O aparato consiste de dois braços abertos perpendiculares (30 x 5 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 25 cm), dispostos perpendicularmente, sendo os braços abertos e fechados conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm) (Insight; Ribeirão Preto, SP, Brasil). As paredes laterais dos braços fechados são feitas de acrílico transparente (15 cm) e o chão de acrílico na coloração cinza, sendo o aparato elevado do chão em 45 cm. Os animais foram individualmente colocados no centro do aparato com a cabeça apontada para os braços abertos e o comportamento registrado durante o tempo de 5 minutos, com o auxílio de uma câmera de vídeo para posterior análise. A frequência

de entrada nos braços abertos e nos fechados, bem como o tempo despendido nos braços abertos (%) e o comportamento de avaliação de risco (ou estiramento corporal) foram analisados.

3.4.3 Teste da suspensão pela cauda (TSC)

O desespero comportamental dos animais intrusos foi avaliado utilizando o TSC através da análise da imobilidade (STÉRU *et al.*, 1985). Os animais foram suspensos 1,0 m do chão por uma fita adesiva colocada aproximadamente 1 cm do final da cauda e avaliados durante 5 min. Os animais foram submetidos ao teste individualmente e o comportamento do animal foi registrado com o auxílio de uma câmera de vídeo para posterior análise do tempo de imobilidade.

3.4.4 Teste de realocação de objetos

A memória não aversiva dos animais intrusos foi avaliada usando o teste de realocação de objetos. O protocolo utilizado foi descrito anteriormente por Assini e colaboradores (2009), com algumas modificações. O aparato experimental usado neste estudo consistiu de uma caixa de acrílico transparente (50 x 50 x 50 cm), na qual foram dispostos dois objetos retangulares de plástico idênticos (4 cm altura x 4.5 cm comprimento) e uma pista visual fixada em uma das paredes. Durante a sessão de treino, os objetos foram inseridos na caixa equidistantes da parede contendo a pista (7 cm) e paralelamente entre si, como mostrado na Figura 5, etapa 1. Os animais intrusos foram colocados no centro da caixa, e próximos da parede oposta à pista e a localização dos objetos. A exploração dos objetos foi avaliada durante 3 min, sendo considerada exploração quando o animal esteve em 1. contato direto com os objetos ou 2. contato indireto (exploração sensorial) com os objetos, em um perímetro igual ou menor que 1 cm de distância. Após a sessão de treino, os animais foram removidos do aparato por um intervalo de 90 min, seguido da sessão de teste. Como mostrado na Figura 5, etapa 2, durante a sessão de teste um dos objetos foi movido para uma localização diagonal ao outro objeto. A duração da sessão de teste foi de 3 min e o comportamento do animal durante as diferentes sessões foi registrado com o auxílio de uma câmera de vídeo para posterior análise dos parâmetros comportamentais. O

tempo gasto pelos animais explorando o objeto familiar (F) – o que permaneceu na mesma posição da sessão de treino – e o objeto realocado (R) foi considerado para avaliação do parâmetro de memória e expresso em porcentagem em relação ao tempo total de exploração dos objetos.

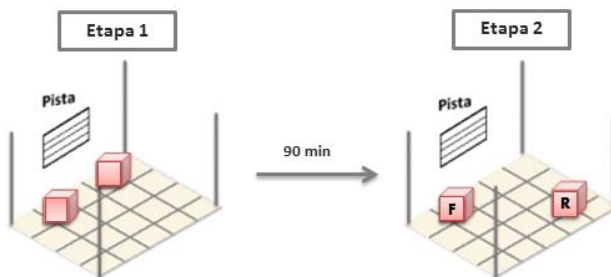


Figura 5. Esquema representativo das etapas do teste de realocação de objetos (adaptado de BICCA, 2012)

3.4.5 Teste da preferência por sacarose

O teste da preferência por sacarose foi realizado para avaliar o possível comportamento anedônico induzido pelo modelo de derrota social nos animais intrusos e consiste em um protocolo de livre escolha entre duas soluções, água e sacarose 0,8% (WILLNER, MUSCAT, PAPP, 1992). Os animais, que já se encontravam alojados em caixas individuais devido ao isolamento do protocolo de derrota social, foram habituados a beber de duas garrafas contendo água, no segundo dia do protocolo experimental do modelo de derrota social. Após 24h da fase de habituação, no terceiro dia do protocolo experimental, uma das garrafas contendo água foi trocada por uma solução de sacarose 0.8% (m/v). No dia seguinte, as garrafas tiveram suas posições invertidas para evitar o viés da preferência pelo local onde a garrafa estava situada (Figura 6). As garrafas foram pesadas diariamente antes e depois de serem colocadas para os animais, para avaliar o consumo das diferentes

soluções. A preferência pela solução de sacarose foi calculada da seguinte forma: $[(\text{consumo de sacarose})/(\text{consumo de água} + \text{consumo de sacarose})] \times 100$ e expressa em porcentagem.

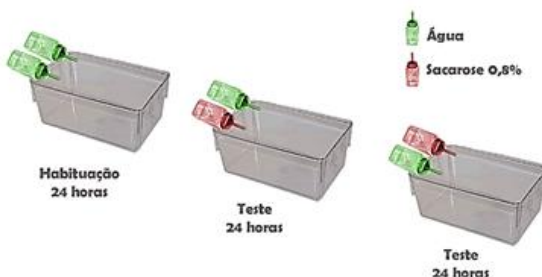


Figura 6. Esquema representativo do teste de preferência por sacarose (SILVA, 2012)

3.5 Obtenção do material biológico

Para a mensuração dos níveis plasmáticos de corticosterona (CORT), os animais foram anestesiados em uma câmara saturada com isoflurano 2,5% (Isoforine®; Cristália Produtos químicos farmacêuticos Ltda.; Itapira, SP, Brasil) e decapitados após o término do teste de partição. O sangue foi coletado e armazenado em tubos refrigerados contendo 40 µl de heparina sódica (Roche; São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, o sangue foi centrifugado a 1500 r.p.m. por 10 min, o sobrenadante (plasma) foi coletado e armazenado a -80° C até o período da mensuração da corticosterona.

Para a realização da técnica de histoquímica, imunoistoquímica e imunofluorescência os animais foram anestesiados com uma solução de quetamina/xilazina (Dopalen® e Anasedan®; Sespo Indústria e Comércio Ltda; Paulínia, SP, Brasil; 100:5 mg/kg), por via intraperitoneal e, em seguida, realizada a perfusão transcardíaca com salina 0.9% seguida de paraformaldeído (PFA 4%). Os encéfalos foram coletados e fixados na mesma

solução de PFA 4% por 24 h a 4°C, e então crioprotégidos em solução de sacarose (15 - 30%) a 4° C. Secções coronais com espessura de 5 ou 25 µm foram obtidas utilizando o criostato Leica CM 1850 (Leica Microsystems Inc.; Buffalo Grove, IL, EUA) do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) II do Centro de Ciências Biológicas (CCB), da UFSC.

Para a realização dos experimentos de *Western blotting*, os animais foram anestesiados em uma câmara saturada com isoflurano 2,5% (Isoforine®; Cristália Produtos químicos farmacêuticos Ltda.; Itapira, SP, Brasil) após o término do teste de partição, para a coleta de tecido cerebral. Os encéfalos foram removidos e lavados com solução salina (NaCl 0,9 %) resfriada à 4° C e, imediatamente após, dissecados sobre uma placa de Petri sobreposta em gelo. Os hipocâmpos e a porção pré-frontal do córtex foram retirados e depositados em microtubos plásticos e armazenados em *freezer* à - 80° C até o período de realização dos experimentos.

3.6. Cultura astrogliar primária de córtex de ratos

Os experimentos com cultura primária de córtex foram realizados em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. William Klein no Departamento de Neurobiologia da *NorthWestern University* em Evanston, IL, EUA.

Foram utilizados embriões de ratos da linhagem Sprague-Dawley obtidos de ratas com 18 dias de gestação provenientes do Biotério da *NorthWestern University*. Para extração do saco uterino contendo os embriões foi realizada uma laparotomia. Após a obtenção dos embriões, os mesmos foram decapitados e os cérebros foram removidos e transferidos para uma placa de Petri contendo solução HBSS. Com o auxílio de uma lupa, as meninges foram retiradas e o córtex dos animais foi dissecado. O tecido obtido foi fracionado com auxílio de um bisturi estéril e, após a transferência do tecido para um tubo Falcon, as células foram dissociadas mecanicamente com pipeta Pasteur de vidro em solução contendo tripsina (0,25%) e centrifugadas a 1000 r.p.m. por 5 min à temperatura ambiente. Após a remoção do sobrenadante, as células foram ressuspensas em meio DMEM (Gibco; Grand Island, NY, EUA), 0,6% glicose, 1% penicilina-estreptomicina e 10% soro de cavalo. A estimativa de células viáveis foi realizada com a coloração

de azul de Trypan e a contagem em câmara de Neubauer (100 µl da suspensão de células + 900 µl de solução azul de Trypan). O plaqueamento foi realizado em placas de 40 mm previamente tratadas com poli-L-lisina a 10µg/mL (Sigma- Aldrich; St. Louis, MO, EUA) para a realização da técnica de *Western blotting* ou em lâminulas de vidro 15 mm esterilizadas e também tratadas com poli-L-lisina para a realização da técnica de imunocitoquímica. As culturas foram mantidas a 37° C, em estufa contendo 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias até a confluência das células nas placas ou lâminulas para a realização dos experimentos.

3.7 Ensaios bioquímicos

3.7.1 Dosagem de corticosterona

A coleta das amostras para determinação do nível de CORT dos animais foi realizada segundo descrito no item 3.5 e analisadas usando o *kit* para ELISA (do inglês; *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Cat. N^o. 901-097; Enzo Life Sciences Inc.; Farmingdale, NY, EUA), conforme as instruções do fabricante.

3.7.2 Histoquímica para Fluoro-Jade B

A histoquímica para coloração de Fluoro-Jade B foi usada como indicativo de degeneração neuronal (SCHMUED & HOPKINS, 2000). Para coloração, as fatias foram obtidas como descrito no item 3.5 e foram realizadas incubações em série com álcool em concentrações decrescentes (100 - 70%) para a hidratação dos cortes, terminando incubadas em água destilada. Em seguida, para a redução da marcação inespecífica, as fatias foram incubadas em solução de permanganato de potássio 0,06% durante 15 min, seguido por três lavagens com água destilada durante 5 min cada. Após as lavagens as fatias foram então incubadas com solução para coloração de Fluoro-Jade B (0,01% solução de Fluoro-Jade B e 0,1% ácido acético em água destilada) durante 30 min. Após a coloração, as lâminas foram lavadas por três vezes de 5 min, com água destilada, sob leve agitação. Em seguida, o excesso de água foi retirado e as lâminas foram montadas com meio Tissue-

Tek® O.C.T compound (do inglês; *Optimal Cutting Temperature*; Sakura Finetek; Torrance, CA, EUA). Os cortes corados com Fluoro-Jade B foram examinados e as imagens capturadas em uma magnificação de 400X, utilizando o microscópio Olympus BX41 (Olympus America Inc.; Center Valley, PA, EUA) localizado no LAMEB II, CCB, UFSC.

3.7.3 Imunoistoquímica

Os cortes histológicos de 5 µm, obtidos como descrito em 3.5, foram fixados em lâminas silanizadas para realização da técnica de imunoistoquímica. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado utilizando 1,5% de peróxido de hidrogênio em metanol (v/v) por 20 min, com posterior lavagem em água destilada, com a finalidade de eliminar reações falso-positivas provenientes da revelação. Em seguida, as lâminas foram submersas em PBS contendo 1% de BSA, durante 40 min no mínimo à temperatura ambiente, sob leve agitação, com intuito de bloquear as possíveis reações inespecíficas. Posteriormente, foi incubada sobre os cortes teciduais a solução contendo o anticorpo policlonal primário feito em coelho contra a proteína de interesse: anti-SP (1:100; Cat. N°. AB1566; Merck Millipore; Billerica, MA, EUA) e as lâminas foram mantidas em câmara úmida a uma temperatura de 2-8° C, durante 14–16 h. Após o período de incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas três vezes por 5 min com PBS à temperatura ambiente e posteriormente incubadas com o anticorpo secundário biotilado anti-coelho (1:250; Cat. N°. E0432; Dako Cytomation; Glostrup, Copenhagen, Dinamarca) em câmara úmida durante 50 min à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com solução de peroxidase-streptavidina (Dako Cytomation; Glostrup, Copenhagen, Dinamarca) por 40 min em câmara úmida à temperatura ambiente. A etapa seguinte consistiu na lavagem das lâminas e incubação em uma solução cromógena (0,03% de 3,3'-diaminobenzidina e 0,3% de peróxido de hidrogênio em PBS). Posteriormente, foi realizada a contra coloração em solução de hematoxilina de Harris, diferenciação em água amoniacal 0,5% e diafanização das lâminas, seguida de montagem com meio Entellan (Merck; São Paulo, SP, Brasil).

A reação imunoistoquímica foi avaliada em três diferentes sub-regiões do hipocampo dorsal: CA1, CA3 e GD, sendo também avaliada a região do córtex cerebral. As imagens dos cortes foram capturadas e digitalizadas por uma câmera digital (Sight DS-5M-L1) acoplada a um microscópio óptico (Nikon; Melville, NY, EUA). As imagens foram capturadas com precisão em cada sub-região do hipocampo e no córtex em três diferentes cortes de cada animal, adquiridas em ampliação de 400 vezes, sendo todas as imagens adquiridas no mesmo microscópio sob as mesmas configurações. Ainda, foi realizada uma foto representativa da formação hipocampal (FH) em um aumento de 20X, para cada corte. A quantificação relativa da imunomarcção foi obtida através da análise de densitometria (densidade óptica) automática, utilizando o programa de imagens NIH ImageJ versão 1.40g (NIH; Bethesda, MD, EUA). Os resultados foram obtidos como unidades arbitrárias da densidade óptica e os dados gráficos representam os valores médios obtidos através da análise separada e conjunta das imagens de CA1, CA3 e GD do hipocampo e do córtex, e expressos como porcentagem do controle.

3.7.4 Imunofluorescência

Em um primeiro momento, os experimentos de imunofluorescência foram realizados em fatias de 5 μ m obtidas como descrito anteriormente no item 3.5. As lâminas contendo os cortes histológicos foram incubadas em acetona P.A. durante 10 min para fixação e permeabilização, e posteriormente, lavadas em PBS por três vezes de 5 min cada. Em seguida, as lâminas foram submersas em PBS contendo 0.1% de Triton X-100 e 1% de BSA, durante no mínimo 40 min à temperatura ambiente, sob leve agitação, com intuito de bloquear as possíveis reações inespecíficas. Posteriormente, foi incubada sobre os cortes teciduais a solução contendo os anticorpos contra as proteínas de interesse: anticorpo monoclonal feito em camundongo anti- GFAP (1:300; Cat. N°. 36705; Cell Signaling Technology; Danvers, MA, EUA) e anticorpo policlonal feito em cabra anti- Iba-1 (1:300; Cat. N°. Ab5076; Abcam; Cambridge, MA, EUA) e as lâminas foram mantidas em câmara úmida a uma temperatura de 2 - 8°C, durante 14 - 16 h. Após o período de incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas três vezes de 5 min com PBS à temperatura ambiente e posteriormente incubadas com os seguintes anticorpos

secundários fluorescentes: anticorpo feito em burro anti-camundongo Alexa® 488 (1:250; Cat. N°. A21202; Thermo Scientific; Rockford, IL, EUA) e anticorpo feito em burro anti-cabra Alexa® 568 (1:250; Cat. N°. A11057; Thermo Scientific; Rockford, IL, EUA) em câmara úmida durante 120 min à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas por três vezes de 5 min com PBS e, então, incubadas com solução 0,05% de Hoechst 33342 (1mg/ml; Thermo Scientific; Rockford, IL, EUA) por 20 min à temperatura ambiente, para marcação nuclear. A etapa seguinte consistiu na lavagem das lâminas com PBS e montagem com meio Tissue-Tek® *O.C.T compound* (do inglês; *Optimal Cutting Temperature*; Sakura Finetek; Torrance, CA, EUA).

A marcação de imunofluorescência foi avaliada em três diferentes sub-regiões do hipocampo dorsal: CA1, CA3 e GD e no córtex cerebral. As imagens dos cortes foram capturadas e digitalizadas utilizando microscópio de fluorescência Olympus BX41 (Olympus America Inc.; Center Valley, PA, EUA) acoplado à câmera digital. A aquisição das imagens foi realizada em uma magnificação de 400X de cada sub-região do hipocampo e do córtex, em três diferentes cortes de cada animal, sendo todas as imagens adquiridas no mesmo microscópio sob as mesmas configurações. Ainda, foi realizada uma foto representativa da FH em um aumento de 20X, para cada corte. A quantificação relativa da imunomarcação foi obtida através da contagem de células positivas por corte tecidual, utilizando o programa de imagens NIH ImageJ 1.40g (NIH, Bethesda, MD, EUA). Os resultados foram transformados em porcentagem do controle e representados de maneira conjunta (total) e separadamente para a sub-região CA1, CA3 e GD do hipocampo e para o córtex.

Em um segundo momento a imunofluorescência foi realizada pela técnica de *free-floating* em fatias de 25 µm, obtidas como descrito em 3.5. Após o bloqueio da peroxidase endógena (10% metanol; 3% H₂O₂ em TBS) por 5 min, as fatias foram lavadas por três vezes de 5 min em TBS. Em seguida, as fatias foram incubadas com solução de extração (0,3% Triton X-100 em TBS) por três vezes de 10 min. Foi então realizado nas fatias o bloqueio das possíveis reações inespecíficas (10% NGS, 0,3% Triton X-100 em TBS) por 40 min sob leve agitação. Posteriormente, as fatias foram incubadas com os anticorpos primários contra as proteínas de interesse que estão descritos na Tabela 2, à temperatura de 2- 8° C, por 14 – 16 h. As fatias foram então lavadas com TBS por três vezes

de 10 min e incubadas com os anticorpos secundários fluorescentes apropriados para cada anticorpo primário utilizado, na concentração de 1:2000, por 2 h em temperatura ambiente. Após a incubação, as fatias foram lavadas em TBS por três vezes de 10 min e procedida à montagem das lâminas com meio *Prolong Gold* contendo DAPI (marcador nuclear) (Thermo Scientific; Rockford, IL, EUA). Os experimentos foram realizados de duas a três vezes de maneira independente, dependendo do marcador. Os cortes foram examinados e as imagens adquiridas, para alguns marcadores, utilizando o microscópio confocal fluorescente LEICA SP5 II *Laser Scanning* (Leica Microsystems Inc.; Buffalo Grove, IL, EUA) localizado na *Biological Imaging Facility* (BIF) da *NorthWestern University* campus Evanston, IL, EUA. Ainda, em outro experimento independente os cortes foram examinados e as imagens adquiridas utilizando o microscópio de fluorescência Olympus BX41 (Olympus America Inc.; Center Valley, PA, EUA) localizado no LAMEB II, do CCB, UFSC. Por fim, em um experimento adicional foi avaliado a colocalização entre dois marcadores utilizando para aquisição das imagens o microscópio de fluorescência TissueFAXS® (TissueGnostics; Viena, Austria) e posterior análise de citometria de tecido pelo programa acoplado ao sistema StrataQuest 5.0 (TissueGnostics; Viena, Austria). Para as imagens capturadas utilizando o microscópio de fluorescência do LAMEB e do BIF foi utilizada magnificação de 400X nas imagens de cada sub-região do hipocampo e do córtex, em três diferentes cortes de cada animal, usando um sistema de filtros fluorescentes adequados para cada marcador utilizado. Para as análises realizadas utilizando o microscópio de fluorescência TissueGnostics as lâminas foram escaneadas por completo, sendo obtidas imagens em alta resolução de todo o corte cerebral em todos os filtros fluorescentes para cada marcador utilizado. As regiões de interesse foram então selecionadas e a mensuração da colocalização realizada por diferenciação automática de intensidade pelo programa.

3.7.5 Imunocitoquímica

Para a realização da técnica de imunocitoquímica, após o tempo decorrido de incubação com o tratamento (SP 1 mM ou veículo), o meio de cultura foi aspirado das placas e adicionado 500 µL de meio de cultura novo (DMEM) acrescido de 500 µL de paraformaldeído 3.7%, e incubado na estufa a 37° C por 10 min,

para fixação das células. Posteriormente, a solução foi aspirada e adicionado 500 µL de paraformaldeído 3.7% e novamente incubadas em estufa a 37 por 10 min. As lâminulas foram então lavadas com PBS por três vezes de 5 min e incubadas com solução de bloqueio (10% NGS em PBS) durante 1 h. Após o bloqueio, para reduzir a marcação inespecífica, as lâminulas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários contra as proteínas de interesse: anticorpo monoclonal fluorescente Cy3 anti- GFAP (1:500; Cat. N°. C9205; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA) e anticorpo policlonal feito em coelho anti-NK1 (1:500; Cat. N°. PA16175; Thermo Scientific; Rockford, IL, EUA), à temperatura de 2 – 8° C, por 14 – 16 h. Após a incubação as lâminulas foram lavadas em TBS por três vezes de 10 min e procedida a incubação com o anticorpo secundário fluorescente: anticorpo feito em cabra anti-coelho Alexa® 488 (1:2000; Cat. N°. A11044; Thermo Scientific fisher; Rockford, IL, EUA) por 2 h, à temperatura ambiente seguida de lavagens com TBS por três vezes de 10 min. Em seguida, foi realizada a montagem das lâminulas com meio *Prolong Gold* contendo DAPI (marcador nuclear) (Thermo Scientific; Rockford, IL, EUA). As imagens foram adquiridas usando o microscópio Olympus BX41 (Olympus America Inc.; Center Valley, PA, EUA) localizado no LAMEB II, CCB, UFSC.

3.7.6 Análise por Western blotting

3.7.6.1 Preparo do extrato celular total do tecido cerebral e determinação de proteínas

As amostras para a realização da técnica de *Western blotting* foram obtidas como descrito anteriormente no item 3.5. As amostras de hipocampo e córtex cerebral foram homogeneizadas manualmente (com auxílio de micro pistilos) em tampão RIPA composto por Nonidet P-40 1% (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA), deoxicolato de sódio 0,5%, dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% e PBS (pH 7,4) na presença dos seguintes inibidores enzimáticos: leupeptina 20 ug/ml, aprotinina 10 ug/ml, pepstatina A 20 ug/ml e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 1 mM. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas em gelo por 30 min e, em seguida, centrifugadas (10.000 r.p.m., 4° C, durante 10 min). O sobrenadante

foi coletado e novamente centrifugado sob as mesmas condições. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi coletado, sendo este o extrato celular total contendo as proteínas dissolvidas no meio. Em seguida, foi realizada a determinação de proteínas das amostras preparadas utilizando o equipamento NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 e a função *Protein A280* do programa NanoDrop 1000 v3.7 (Thermo Scientific; Rockford, IL, EUA). Os extratos dos tecidos previamente preparados foram diluídos de modo a apresentar a mesma concentração de proteína (5,5 mg/ml), misturados em volumes iguais ao tampão de amostra 5 vezes concentrado (Tris-HCl 150 mM (pH 6,8), β-mercaptoetanol 15 %, SDS 6 %, azul de bromofenol 0,3 %, glicerol 25 %) e fervidas por 5 min à 100° C. As amostras foram armazenados em *freezer* a -20°C até o momento do uso.

3.7.6.2 Preparo do extrato celular total da células gliais cultivadas e determinação de proteínas

As células gliais proveniente do córtex foram cultivadas em placas de 40 mm até a formação de uma camada de células homogênea. O meio de cultura das placas foi aspirado e as células foram lavadas com 1 ml de HBSS por duas vezes, sob movimentação suave. Após as lavagens, foi adicionado 50 uL de solução contendo tampão RIPA e inibidores de proteases. Com o auxílio de uma espátula de plástico, as células foram raspadas para remoção da placa de cultivo e transferidas para microtúbulos identificados e mantidos no gelo. Decorridos 30 min, os microtúbulos foram centrifugados e o sobrenadante foi coletado para o preparo das amostras. Em seguida, foi realizada a determinação de proteínas das amostras preparadas utilizando o kit *BCA protein assay* (Thermo Scientific; Rockford, IL, EUA) conforme recomendações do fabricante. O sobrenadante de cada amostra foi diluído de modo a apresentar a mesma concentração de proteína (1,7 mg/ml), acrescidos em volumes iguais ao tampão de amostra 5 vezes concentrado (Tris-HCl 150 mM (pH 6,8), β-mercaptoetanol 15 %, SDS 6 %, azul de bromofenol 0,3 %, glicerol 25 %) e fervidas por 5 min à 100° C. As amostras foram armazenadas em *freezer* a -20°C até o momento do uso.

3.7.6.3 Imunodeteção de proteínas por Western blotting

Para a realização dos experimentos de *Western blotting*, quantidades iguais de proteínas para cada amostra de tecido cerebral (30 ou 40 ug) ou de cultura de células glias (15 ug), foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS (12-20%). A etapa de transferência das proteínas contidas no gel para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules, CA, EUA) foi realizada sob as seguintes condições: 100 V e 30 mA durante 1 h. Após a transferência, para o bloqueio das reações inespecíficas, as membranas foram imersas em solução de TBS-T (Tris 1,2 g; NaCl 8,76 g e Tween 20 0,05% em água destilada) contendo BSA (5%) por no mínimo 1 h a 2 – 8° C. Após a lavagem em TBS-T (5 vezes), as membranas foram incubadas durante 14 - 16 h (2 – 8° C), com os anticorpos primários contra as proteínas de interesse (ver Tabela 2). A próxima etapa consistiu na incubação dos anticorpos secundários conjugados à peroxidase, específicos para cada anticorpo primário (1:25000 - Cell Signaling Technology; Danvers, MA, EUA) durante 2 h à temperatura ambiente. Os imunocomplexos foram visualizados usando sistema de detecção de substrato quimioluminescente, *SuperSignal West Femto* (Thermo Scientific; Rockford, IL, EUA) e exposto ao sistema de fotodocumentação *ChemiDocTMXRS* (Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules, CA, EUA) do LAMEB I, do CCB, UFSC ou revelados utilizando uma estação de fotodocumentação KodaK 4400CF (KodaK; Rochester, NY, EUA) do laboratório de Neurobiologia da NorthWestern University, campus Evanston, IL, EUA. As análises foram realizadas utilizando o programa NIH *ImageJ* 1.40g (NIH; Bethesda, MD, EUA) através da quantificação da densidade óptica. Os valores foram normalizados contra o controle β -actina e expressos graficamente como porcentagem do controle.

Tabela 2. Descrição dos anticorpos utilizados para a realização das técnicas moleculares

Anticorpo primário	Código	Companhia	Anticorpo secundário	Código	Companhia	Diluição	Técnica
^{pAc} anti- NK1	PA16175	Thermo Scientific	anti-rabbit	#70745	Cell Signaling	1/1000 - 1/25000	WB
	PA16175	Thermo Scientific	Alexa 488 (goat anti-rabbit)	A11044		1/500 - 1/2000	IF
^{pAc} anti-substância P	AB1566	Merck Millipore				1/500 - 1/2000	IHC
^{mAc} anti-GFAP	36705	Cell Signaling	Alexa 488 (donkey anti-mouse)	A21202	Thermo Scientific	1/300 - 1/250	IF
	36705	Cell Signaling	anti-mouse	#7076	Cell Signaling	1/1000 - 1/25000	WB
	C9205	Sigma	-		-	1/500 - 1/2000	IF ⁽¹⁾
^{pAc} anti-Iba-1	Ab5076	Abcam	anti-goat	sc-2020	Santa Cruz	1/500 - 1/25000	WB
	Ab5076	Abcam	Alexa 568 (donkey anti-goat)	A11057	Thermo Scientific	1/300 - 1/250	IF
^{pAc} anti-BDNF	Ab6201	Abcam	Alexa 488 (goat anti-rabbit)	A11034	Thermo Scientific	5µg/ml - 1/2000	IF
			anti-rabbit	#70745	Cell Signaling	1/1000 - 1/25000	WB
^{pAc} anti-Doublocortina	BS-1269R	Bioss	Alexa 488 (goat anti-rabbit)	A11034	Thermo Scientific	1/500 - 1/2000	IF
			anti-rabbit	#70745	Cell Signaling	1/1000 - 1/25000	WB
^{pAc} anti-GR	SAB4501310	Sigma	Alexa 488 (goat anti-rabbit)	A11034	Thermo Scientific	1/500 - 1/2000	IF
			anti-rabbit	#70745	Cell Signaling	1/1000 - 1/25000	WB
^{pAc} anti-espinofilina	BS-12146R	Bioss	Alexa 488 (goat anti-rabbit)	A11034	Thermo Scientific	1/500 - 1/2000	IF
Hoescht	33342	Thermo Scientific				0,05%	IF

GFAP: proteína glial ácida fibrilar; **Iba-1:** molécula adaptadora da ligação de cálcio ionizado 1; **BDNF:** fator neurotrófico derivado do cérebro; **GR:** receptor de glicocorticóide; **WB:** *Western blotting*; **IF:** imunofluorescência; **IHC:** imunistoquímica;

⁽¹⁾ anticorpo primário conjugado ao fluoróforo; ^{pAc} anticorpo policlonal; ^{mAc} anticorpo monoclonal.

3.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad® versão 5.0 (GraphPad Software Inc.; La Jolla, CA, EUA). Os resultados experimentais foram expressos como média \pm E.P.M. O teste Student *t* não pareado foi usado para avaliar as diferenças entre os grupos controle (sem agressor) e o grupo derrotado. A análise para avaliar as diferenças entre os grupos tratados foi feita por da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Dunnett. Para a análise dos resultados obtidos das técnicas moleculares no qual há duas variáveis (estresse e o tratamento) foi feito o uso da análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni. O nível de significância adotado neste trabalho para todas as análises foi $p \leq 0,05$.

3.9 Protocolo Experimental

O protocolo experimental foi conduzido como ilustrado na Figura 7. Os experimentos comportamentais para avaliação do decurso temporal das respostas comportamentais defensivas são representados na Fig. 9A. A coleta das amostras para a realização dos experimentos bioquímicos e moleculares ocorreu após o protocolo de modelo de derrota social com sessões de treino de 3 h e teste de partição 24 h após a última sessão de treino (Fig. 9A). A Fig. 9B mostra o protocolo para avaliação dos testes comportamentais que foi realizado com sessões de derrota de 3 h e exposição aos diferentes testes 24 h após a última sessão de estresse. A Figura 7C representa o esquema adotado para avaliação do efeito do tratamento com o antagonista do receptor NK1 que também no protocolo de derrota social adotado com duração de 3 h por 3 dias consecutivos e teste de partição 24 h após o último evento estressor, sendo administrado o antagonista dos receptores NK1, via intraperitoneal, 30 min antes da realização do teste.

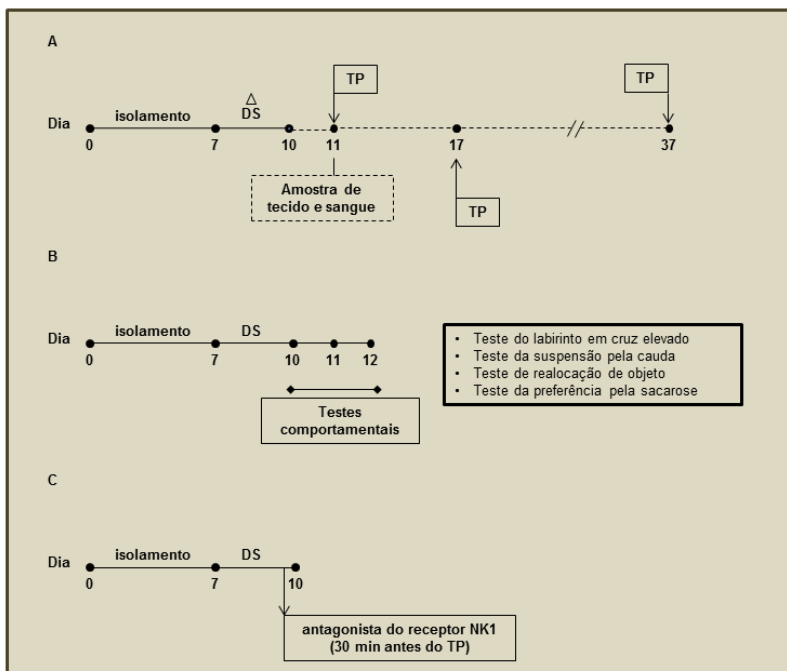


Figura 7. Esquema representativo do protocolo experimental adotado no estudo. (A) Após o período de 7 dias de isolamento, grupos independentes de animais foram submetidos a diferentes tempos de derrota social (DS; 1, 3 e 6 h) seguido pelo teste de partição que ocorreram 24 h, 7 dias e 30 dias após a última sessão de treino. A coleta de amostra de tecido e sangue ocorreu após a finalização do protocolo experimental - somente após o protocolo de derrota social com duração de 3 h seguido pelo teste de partição 24 h após o último evento estressor. (B) Protocolo adotado para avaliar alterações comportamentais usando o protocolo de derrota social com duração de 3h, sendo os diferentes testes comportamentais realizados 24 após a última sessão de derrota. (C) Os animais foram tratados com o antagonista dos receptores NK1 30 min antes de serem avaliados no teste de partição que ocorreu 24 h após a última sessão treino do protocolo de derrota social de duração de 3 h por 3 dias consecutivos. Δ = tempos distintos em que os animais foram submetidos as sessões de treino; DS= Derrota Social; TP = Teste de partição

4. RESULTADOS

A proposta inicial do estudo consistiu em realizar uma otimização temporal do modelo de derrota social, seguido pelo teste de partição, como mostrado na Tabela 3. A partir desta etapa de padronização comportamental, foi eleito um tempo determinado no qual as respostas comportamentais defensivas se mostraram mais evidentes para prosseguir com a investigação molecular e uma possível abordagem farmacológica decorrente das alterações promovidas pelo modelo de estresse social.

Tabela 3. Esquema dos diferentes tempos adotados na realização dos protocolos de derrota social para a determinação das respostas comportamentais defensivas

DS	TP	TP	TP
Grupo 1h	24 h	7 dias	-
Grupo 3h	24 h	7 dias	30 dias
Grupo 6h	24 h	7 dias	-

DS- Derrota Social - duração; **TP-** Teste de partição

4.1. Decurso temporal das alterações nas respostas comportamentais defensivas no teste de partição após o modelo de derrota social

O modelo de derrota social com duração de 10 dias, 21 dias ou mais tem sido amplamente utilizado para estudos de depressão e estresse (BEITIA *et al.*, 2005; KEENEY *et al.*, 2006; IÑGUINEZ *et al.*, 2014). A fim de caracterizar um protocolo de estresse, para o estudo do TEPT com a mínima interferência dos comportamentos associados à depressão, decidimos realizar uma otimização temporal do modelo de derrota social. Desta maneira, utilizamos sessões de derrota de curta duração, quando comparado aos protocolos experimentais encontrados na literatura, e observamos que após 1, 3 e 6 h de duração do protocolo de derrota

social por três dias consecutivos, é possível observar respostas comportamentais defensivas significativas nos animais derrotados, quando comparado com os animais do grupo controle, avaliados no teste de partição, realizado 24 h após a última sessão de derrota. Mais precisamente, o grupo derrotado (DT) mostrou uma redução significativa do tempo de aproximação na barreira [1 h: $t(15)=2,13$, $p=0,0502$; 3 h: $t(11)=2,59$, $p=0,0251$; 6 h: $t(14)=2,47$, $p=0,0269$] e um aumento na frequência do comportamento de avaliação de risco [1 h: $t(15)=1,80$, $p=0,0912$; 3 h: $t(11)=2,74$, $p=0,0193$; 6 h: $t(14)=2,70$, $p=0,0173$] quando comparado ao grupo controle (CTL), como mostrado na Figura 8 A e B, respectivamente

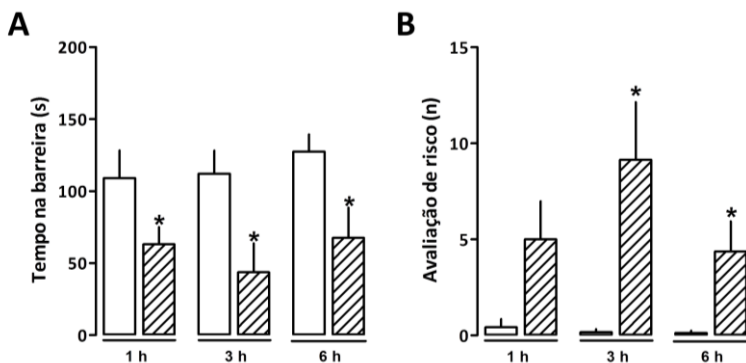


Figura 8. Avaliação da resposta comportamental defensiva, após um estresse promovido pelo modelo de derrota social, 24 h após a última sessão de estresse. Os animais foram submetidos ao protocolo de derrota social em três diferentes tempos, 1, 3 ou 6h de duração da sessão de estresse por 3 dias consecutivos e avaliados 24 h após no teste de partição. Os animais derrotados (barras hachuradas) apresentaram (A) redução do tempo de aproximação na barreira e (B) um aumento do comportamento de avaliação de risco quando comparado ao grupo controle (barras vazadas). A análise estatística foi realizada comparando o grupo controle vs o grupo derrotado de cada tempo específico. Os valores estão expressos como a média + E.P.M. (N = 8 – 10/grupo). * $p \leq 0,05$; teste “t” Student quando comparado ao grupo controle (todas as etapas sem o animal residente).

Ainda, uma resposta semelhante, foi observada em grupos independentes de animais submetidos ao modelo de derrota social e avaliados no teste de partição 7 dias (Figura 9 A e B) após o último evento estressor. Nessa sessão, os animais derrotados apresentaram uma redução significativa do tempo de aproximação

na barreira [1 h: $t(14)=3,46$, $p=0,0019$; 3 h: $t(12)=2,96$, $p=0,0059$; 6 h: $t(12)=3,83$, $p=0,0061$] e uma tendência em aumentar o comportamento de avaliação de risco [1h: $t(14)=2,00$; $p=0,0326$; 3h: $t(12)=1,55$; $p=0,0726$; 6h: $t(12)=0,84$; $p=0,2189$]. De modo similar o grupo de animais avaliados no teste de partição 30 dias (Figuras 10 A e B) após a última sessão de treino apresentou de maneira significativa uma redução do tempo de aproximação na barreira [3h: $t(10)=2,40$; $p=0,0530$] e diminuição do comportamento de avaliação de risco [3h: $t(10)=2,44$; $p=0,0498$].

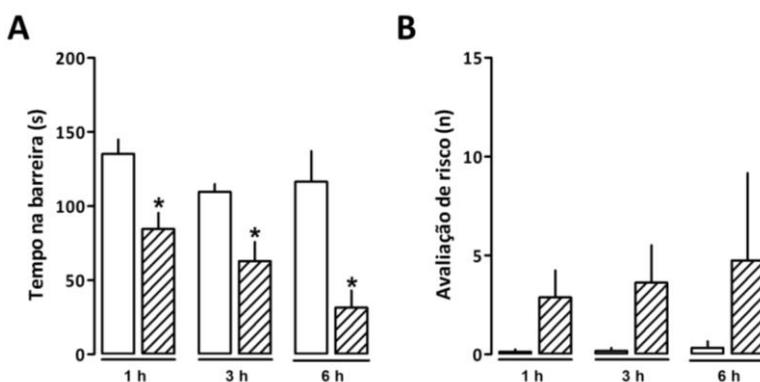


Figura 9. Avaliação da resposta comportamental defensiva, após um estresse promovido pelo modelo de derrota social, 7 dias após a última sessão de estresse. Os animais foram submetidos ao protocolo de derrota social em três diferentes tempos, 1, 3 ou 6h de duração da sessão de estresse por 3 dias consecutivos e avaliados 7 dias após no teste de partição. Os animais derrotados (barras hachuradas) apresentaram (A) redução do tempo de aproximação na barreira e (B) um aumento do comportamento de avaliação de risco quando comparado ao grupo controle (barras vazadas). A análise estatística foi realizada comparando o grupo controle vs o grupo derrotado de cada tempo específico. Os valores estão expressos como a média + E.P.M. (N = 8 – 10/grupo). * $p \leq 0,05$; teste “t” Student quando comparado ao grupo controle (todas as etapas sem o animal residente).

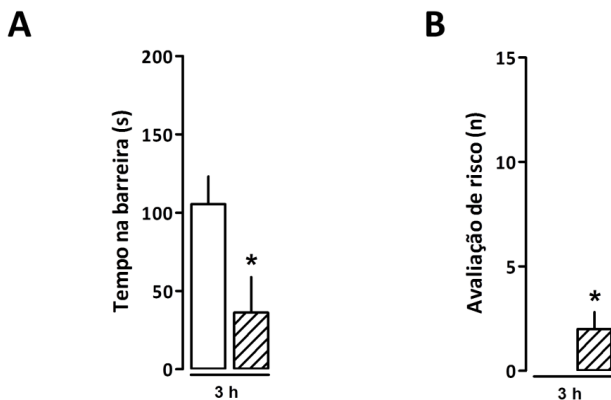


Figura 10. Avaliação da resposta comportamental defensiva, após um estresse promovido pelo modelo de derrota social, 30 dias após a última sessão de estresse. Os animais foram submetidos ao protocolo de derrota social com 3h de duração da sessão de estresse por 3 dias consecutivos e avaliados 30 dias após no teste de partição. Os animais derrotados (barras hachuradas) apresentaram (A) redução do tempo de aproximação na barreira e (B) um aumento do comportamento de avaliação de risco quando comparado ao grupo controle (barras vazadas). A análise estatística foi realizada comparando o grupo controle vs o grupo derrotado de cada tempo específico. Os valores estão expressos como a média + E.P.M. (N = 6/grupo). * $p \leq 0,05$; teste “t” Student quando comparado ao grupo controle (todas as etapas sem o animal residente).

Adicionalmente, foram encontradas diferenças significativas e pontuais nos parâmetros etológicos avaliados como mostra a Tabela 4. Os grupos de animais submetidos às diferentes durações de sessões de derrota apresentaram uma redução significativa do comportamento de levantar ($p \leq 0,05$) quando comparado ao grupo controle no teste de partição realizado 24 h [1h: $t(14) = 2,90$; $p = 0.0110$; 3h: $t(12) = 3,19$; $p = 0.0085$; 6h: $t(12) = 2,23$; $p = 0.0422$] e 7 dias [1h: $t(14) = 4,44$; $p = 0.0006$; 3h: $t(12) = 2,67$; $p = 0.0203$; 6h: $t(12) = 3,43$; $p = 0.0184$] após o último evento estressor. Por outro lado, apenas o grupo de animais derrotados que passaram por sessões de derrota com duração de 3 h e exposição ao teste de partição 24 h apresentaram redução significativa no comportamento de escavação de serragem quando comparado ao grupo controle [$t(14) = 3,19$; $p = 0.0085$].

Tabela 4. Perfil das respostas comportamentais etológicas dos animais submetidos ao modelo de derrota social nos diferentes tempos adotados

		Escavação da serragem (s)		Levantamentos (n)		Auto limpeza (n)	
		CTL	DT	CTL	DT	CTL	DT
24 h	1 h	10,01 ± 4,18	7,13 ± 1,82	25,00 ± 3,48	15,30 ± 1,42 *	1,29 ± 0,18	0,50 ± 0,22 *
	3 h	22,82 ± 3,67	4,70 ± 2,66 *	38,50 ± 6,56	16,86 ± 2,83 *	1,33 ± 0,56	1,14 ± 0,40
	6 h	20,12 ± 3,01	16,53 ± 4,21	26,38 ± 1,47	15,38 ± 4,69 *	1,75 ± 0,25	0,37 ± 0,18 *
7 dias	1 h	18,73 ± 5,03	15,33 ± 3,61	38,13 ± 2,08	22,25 ± 2,90 *	1,63 ± 0,26	1,13 ± 0,61
	3 h	15,65 ± 3,14	18,85 ± 3,88	34,17 ± 3,60	17,88 ± 4,51 *	1,167 ± 0,17	0,50 ± 0,19 *
	6 h	9,41 ± 2,28	35,95 ± 22,18	31,67 ± 2,96	11,75 ± 4,42 *	1,67 ± 0,67	1,00 ± 0,40
30 dias	1h	n	n	n	n	n	n
	3h	30,54 ± 4,38	35,04 ± 13,57	21,75 ± 2,43	11,25 ± 5,61	1,75 ± 0,48	0,75 ± 0,48
	6h	n	n	n	n	n	n

Os valores estão expressos como a média + E.P.M. (N = 6 – 10/grupo). *p < 0,05; teste “t” *Student* quando comparado ao grupo controle (não derrotado). n= tempo não avaliado

Com base nos resultados obtidos das alterações nas respostas comportamentais defensivas, mediante os protocolos adotados com diferentes tempos de exposição do animal intruso ao agente estressor, observa-se que os animais submetidos ao protocolo de derrota social com duração de 3 h apresentaram respostas comportamentais defensivas mais evidentes, sendo este o tempo eleito para o protocolo a ser utilizado nos experimentos seguintes. Ademais, visando às respostas comportamentais mais intensas e a otimização do protocolo experimental, o tempo escolhido para realização do teste de partição foi de 24 h após a última sessão de derrota.

Na tentativa de consolidar o modelo experimental padronizado, algumas adaptações no protocolo originalmente proposto foram investigadas. Os animais que passaram por sessões de treino adaptadas (na ausência do residente) e foram submetidos ao teste de partição padrão (CTL α) não apresentaram respostas comportamentais defensivas, demonstradas pelos parâmetros de tempo de aproximação na barreira (Fig.11A) e de avaliação de risco (Fig. 11B), similares a dos animais do grupo controle (CTL). De modo inverso, os animais que passaram pela sessão de treino padrão na presença do animal residente e foram submetidos ao teste de partição adaptado na ausência deste (DT β) apresentaram uma redução significativa do tempo de aproximação na barreira [F_(2,14) = 6,85; p = 0.0084] (Fig. 11A) e embora não significativo, um

aumento do comportamento de avaliação de risco [$F_{(2,14)} = 0.3243; p = 0.7283$] (Fig. 11B) quando comparados ao grupo controle padrão, assemelhando-se aos animais submetidos ao protocolo experimental padrão. Nossos dados indicam que o aumento nas respostas comportamentais defensivas é dependente da situação de estresse promovida pela exposição do animal ao modelo de derrota social. Ainda, a exacerbação destes comportamentos não está vinculada à presença do animal residente no teste de partição, sugerindo, portanto, a generalização das respostas defensivas causadas pelo protocolo experimental adotado para o modelo de derrota social, sendo esta uma característica fundamental para caracterização de modelos experimentais preditivos para o TEPT.

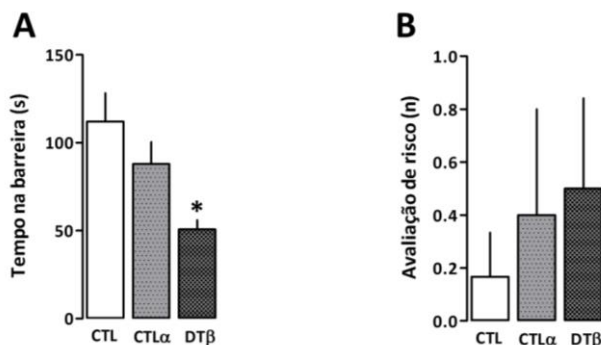


Figura 11. Avaliação da resposta comportamental defensiva, após um estresse promovido pelo modelo de derrota social, 24 h após a última sessão de estresse, na ausência do animal residente. Os animais foram submetidos ao protocolo de derrota social por três dias consecutivos de sessão de estresse com duração de 3 h e teste de partição 24 h após a última sessão de derrota. CTL α , grupo de animais que não foram expostos ao animal residente durante as sessões de treino e foram apresentados a um animal residente no dia do teste de partição. DT β , grupo de animais submetidos à derrota social na presença do animal agressor e o teste de partição foi realizado na ausência do animal residente, porém em sua caixa moradia. (A) Tempo de aproximação na barreira e (B) comportamento de avaliação de risco. Os valores estão expressos como a média + E.P.M. (N = 6/grupo). * $p \leq 0,05$; teste “t” Student quando comparado ao grupo controle (todas as etapas sem o animal residente).

Dados da literatura demonstram que os animais expostos ao protocolo de derrota social por 10 dias apresentam um perfil comportamental tipo depressivo (HUANG *et al.*, 2013; IÑIGUEZ *et al.*, 2014), sendo este comportamento amplamente estudado utilizando-se deste modelo. Com o objetivo de caracterizar um

protocolo de estresse com a mínima interferência dos comportamentos associados à depressão, buscamos avaliar se o protocolo utilizado neste trabalho seria capaz de promover alterações comportamentais além das respostas defensivas observadas. Os comportamentos avaliados foram: tipo ansiedade e tipo depressão, além de déficits de memória, sendo que estas são as comorbidades comumente observadas em associação ao TEPT. Como demonstrado na Figura 12A-C, o estresse promovido pelo protocolo de derrota social promoveu um aumento significativo no nível de ansiedade dos animais, observados no teste do labirinto em cruz elevado. Foi observada a redução do tempo de exploração dos braços abertos pelos animais derrotados, quando comparados ao grupo controle [$t(4) = 3.113$; $p = 0,0358$] (Figura 12A), uma tendência no aumento do comportamento de avaliação de risco [$t(4) = 3,11$; $p = 0.0358$] (Fig. 12B), sem qualquer alteração no número de entradas nos braços fechados [$t(4) = 0,11$; $p = 0.9113$] (Fig. 12C). Assim, sob essa condição de estresse o comportamento dos animais derrotados não difere dos animais controle em relação ao comportamento anedônico (consumo de sacarose) e tipo depressivo (imobilidade no teste de suspensão pela cauda) [$t(16) = 0,29$; $p = 0.7737$; $t(7) = 1,09$; $p = 0.3084$, respectivamente] (Figura 12D e E). Além disso, como evidenciado na Fig. 12F, após o estresse promovido pela derrota social os animais derrotados exibem um índice de exploração de reconhecimento de objeto semelhante ao grupo controle. Estes dados suportam a hipótese de que este protocolo escolhido no presente estudo é capaz de induzir uma resposta defensiva generalizada em resposta ao estresse, alterando parâmetros tipo ansiedade, sem modificar parâmetros tipo depressivos ou cognitivos (memória neutra).

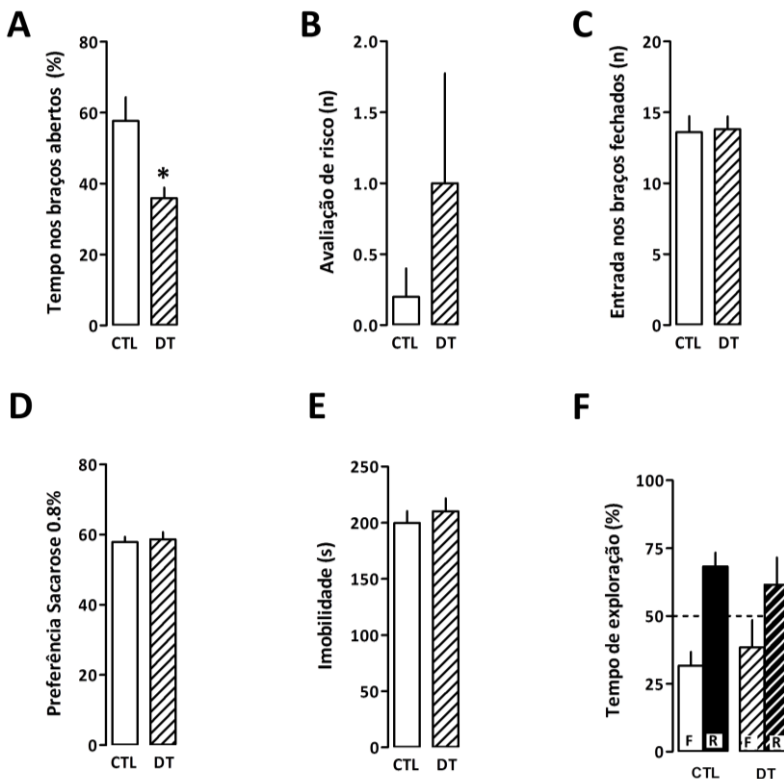


Figura 12. Avaliação dos comportamentos do tipo ansiedade, depressão e cognitivo, após o estresse promovido pelo modelo de derrota social. Grupos independentes de animais foram submetidos ao protocolo de derrota social por três dias consecutivos de sessão de estresse com duração de 3 h e submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado 24 h após a última sessão de derrota. Avaliação dos comportamentos do tipo ansiedade: **(A)** tempo nos braços abertos, **(B)** comportamento de avaliação de risco e **(C)** frequência de entrada nos braços fechados. **(D)** Preferência pela sacarose (comportamento anedônico) e **(E)** teste da suspensão pela cauda (comportamento tipo depressivo). **(F)** tempo de exploração no teste de realocação de objetos. CTL= grupo controle; DT= grupo derrotado; F= familiar; R= realocado. Os valores estão expressos como a média + E.P.M. (N = 8/grupo). * $p \leq 0,05$; teste “t” Student quando comparado ao grupo controle (todas as etapas sem o animal residente).

Em resumo, nossos resultados indicam que o tempo relativamente curto do protocolo de derrota social padronizado em camundongos C57BL/6 (3 dias consecutivos e 3h de exposição),

quando comparado aos protocolos da literatura, é capaz de promover respostas comportamentais defensivas consistentes, sendo estas expressas mesmo na ausência do animal residente. Além disso, o protocolo utilizado induz alterações no nível de ansiedade, mas não em padrões comportamentais avaliados em modelos de depressão e memória neutra, evidenciando a utilidade deste modelo para estudo de transtorno de estresse pós-traumático.

4.2 Evidências do envolvimento da substância P no estresse social

Uma vasta literatura tem demonstrado o envolvimento de neuropeptídios nos distúrbios mentais (para revisão MUÑOZ & COVEÑAS, 2014), em particular o envolvimento da substância P (SP) nas respostas de estresse, tanto em modelos animais (GAVIOLI *et al.*, 1999; RUPNIAK *et al.*, 2001; EBNER *et al.*, 2004; TEIXEIRA, DUARTE, DE LIMA, 2004; DUZZIONI *et al.*, 2008) quanto em estudos clínicos (GERACIOTI *et al.*, 2006; MATHEW *et al.*, 2011). Baseados nestas evidências, o próximo passo consistiu em avaliar o envolvimento da SP no modelo de derrota social.

Inicialmente, a técnica de imunoistoquímica foi realizada na tentativa de verificar o efeito do estresse promovido pela derrota social na marcação de substância P no córtex e hipocampo dos animais submetidos a este protocolo. Foi observado um aumento da imunoreatividade para SP nas sub-regiões CA1, CA3 e GD do hipocampo, e também na região do córtex, resultante do estresse decorrente da derrota social realizada por três dias consecutivos, como é mostrado nas imagens representativas da Fig. 13A. A quantificação relativa da imunomarcação para SP evidencia um aumento significativo nas sub-regiões do hipocampo supracitadas e no córtex dos animais derrotados quando comparados ao grupo controle (Fig. 13B). A fim de confirmar estes resultados, foi realizada a técnica de *Western blotting* (WB) para avaliar a expressão de SP nas amostras totais de hipocampo e córtex obtidos após o protocolo de derrota social. Como pode ser evidenciado na Figura 13C, ocorreu um aumento significativo na imunomarcação para SP no córtex dos animais derrotados, quando comparados ao grupo controle, mas nenhuma alteração foi observada no hipocampo.

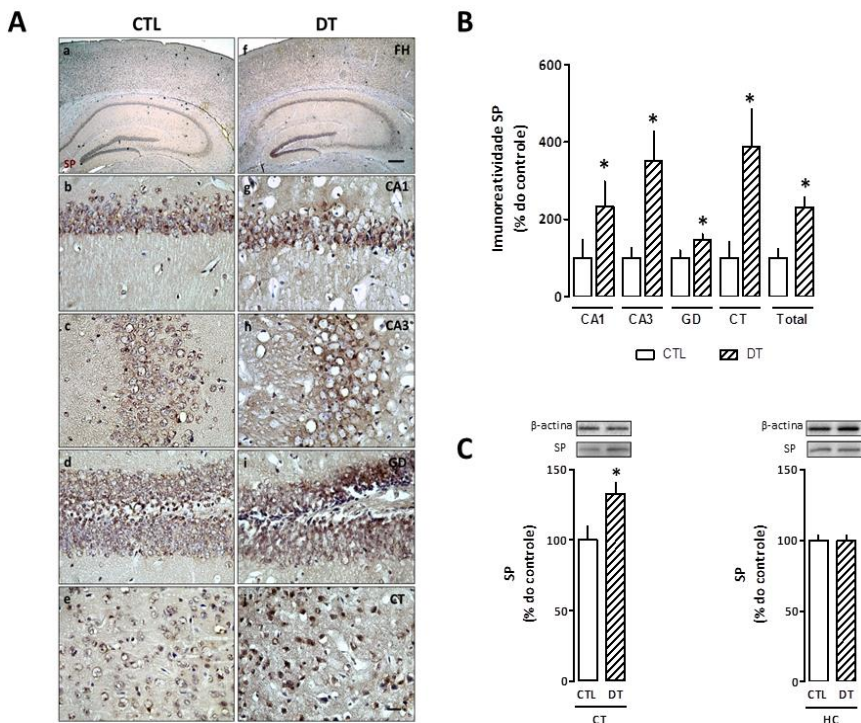


Figura 13. Análise da imunomarcagem para substância P (SP) no córtex e hipocampo dos animais, após um estresse promovido pelo modelo de derrota social. Os cérebros foram coletados imediatamente após os animais serem submetidos ao teste de partição, 24 h após o último episódio de derrota social. (A) Imagens representativas da imunomarcagem para SP nos animais do grupo controle (a-e) comparados ao grupo de animais derrotados (f-j). Aumento de 20x para a formação hipocampal (FH; a,f) e aumento de 400 x para as diferentes sub-regiões do hipocampo (CA1, CA3 e GD; b-d; g-i) e córtex (e;j) (B) Quantificação relativa da medida de densidade ótica da imunoreatividade para a SP avaliada por imunistoquímica nas diferentes regiões acima citadas, determinadas em unidades arbitrárias, sendo expressa como porcentagem do controle. O grupo total correspondente à soma da imunomarcagem nas regiões avaliadas em aumento de 400x. (C) Imagens representativas das bandas obtidas por imunodeteção para a proteína SP (14 kDa) e para o controle interno β-actina (43 kDa) no córtex e hipocampo dos animais. Os gráficos representam a análise da densidade ótica da proteína SP, normalizada contra o controle β-actina, determinada em unidades arbitrárias, sendo expressas como porcentagem do grupo controle (CTL). CTL= grupo controle (todas as etapas sem o animal residente); DT= grupo derrotado; CT= córtex; HC= hipocampo. Escala para o aumento de 20x = 500 μm; escala para o aumento de 400x = 25 μm. Os valores estão expressos como a média + E.P.M. (3 – 4 animais por grupo). * $p \leq 0,05$; teste “t” Student quando comparado ao grupo CTL

Adicionalmente, nós avaliamos a expressão do principal receptor para substância P, o receptor NK1, através da técnica de WB. As análises revelaram que os animais derrotados apresentaram um aumento na expressão do receptor NK1 no córtex, mas não no hipocampo, quando comparado aos animais do grupo controle (Figura 14). Este conjunto de resultados nos permite sugerir o envolvimento do sistema taquicinérgico (SP-receptor NK1) no modelo de derrota social.

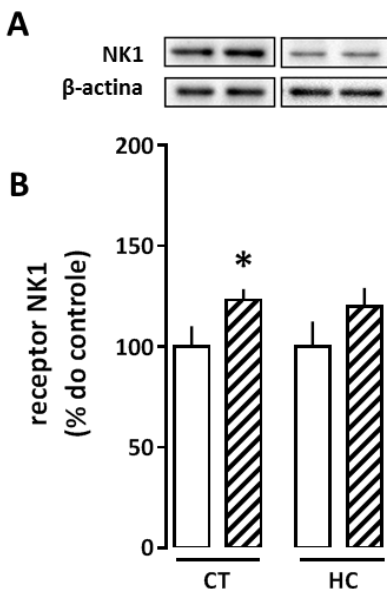


Figura 14. Análise dos níveis de expressão do receptor NK1 no córtex e hipocampo dos animais, após o estresse promovido pelo modelo de derrota social. Os cérebros foram coletados imediatamente após os animais serem submetidos ao teste de partição, 24 h após o último episódio de derrota social. (A) Imagens representativas das bandas obtidas por imunodeteção para a proteína NK1 (54 kDa) e para o controle interno β -actina (43 kDa). (B) O gráfico representa a análise da densidade óptica da proteína SP, normalizado contra o controle β -actina, determinada em unidades arbitrárias, sendo expressos como porcentagem do grupo controle (CTL). CTL= grupo controle (barras vazadas; todas as etapas sem o animal residente); DT= grupo derrotado (barras hachuradas); CT= córtex; HC= hipocampo. Os valores estão expressos como a média + E.P.M. (3 – 4 animais por grupo). * $p \leq 0,05$; teste “t” Student quando comparado ao grupo CTL.

4.3 A importância do sistema taquicínérgico na ativação astrogliar no modelo de derrota social

Já está bem estabelecido na literatura o papel da substância P como mediador pró-inflamatório (WALSH *et al.*, 1995). Além disso, é recente e cada vez mais descrita a participação do processo neuroinflamatório em doenças psiquiátricas (VARGAS *et al.*, 2005; NAJJAR *et al.*, 2013; XIA *et al.*, 2014). Levando em consideração os dados da literatura e os resultados obtidos anteriormente, julgamos pertinente avaliar o possível envolvimento do processo neuroinflamatório nos animais submetidos ao modelo da derrota social. A neuroinflamação é um processo complexo e bem arquitetado, no qual participam células importantes como as células gliais, compreendendo, essencialmente, os astrócitos e as micróglias (RANSOHOFF & PERRY, 2009). Com o intuito de elucidar a participação de algumas destas células do processo neuroinflamatório no modelo de derrota social e também de estimar a importância deste processo no modelo de derrota social decidimos avaliar alguns marcadores: GFAP, como um indicador de ativação e/ou migração astrocitária e Iba-1 como um indicador de ativação e/ou migração microglial. Como mostrado nas imagens representativas de imunofluorescência (IF) na Figura 15A, o estresse promovido pela derrota social produziu um aumento da marcação para o GFAP no hipocampo dos animais (Fig. 15A; f - j), quando comparados aos animais do grupo controle (Fig. 15A; a - e). A análise semiquantitativa das imagens obtidas por IF revelou que ocorre um aumento significativo da marcação para GFAP nas sub-regiões CA1 e CA3 do hipocampo (Fig. 15B). Adicionalmente, as análises por WB na Fig. 15C mostram um aumento significativo dos níveis de GFAP no córtex e hipocampo dos animais derrotados quando comparados ao grupo controle. Em contrapartida, podemos observar nas imagens representativas da Figura 16A, que há uma discreta marcação para Iba-1 nos cérebros dos animais derrotados (Fig. 16A; f - j) em comparação à marcação basal (controle; Fig. 16A; a - e). Após a quantificação relativa das imagens de IF (Fig. 16B), é notável uma diferença significativa apenas na região do córtex dos animais derrotados quando comparados ao grupo controle. O aumento dos níveis de Iba-1 no córtex e não no hipocampo parece ser consistente, visto que os dados obtidos por WB são similares aos encontrados por IF (Fig. 16C). Estes dados sugerem que tanto o astrócito quanto a micróglio parecem desempenhar um papel importante na neurobiologia do modelo de derrota social, sendo que diferentes regiões são afetadas, sugerindo a

atuação distinta de cada célula na manutenção dos processos fisiopatológicos relacionados. Devido à alteração proeminente observada para a ativação e/ou migração astrocitária, estudos posteriores foram realizados para a compreensão do papel destas células na manutenção do modelo de derrota social.

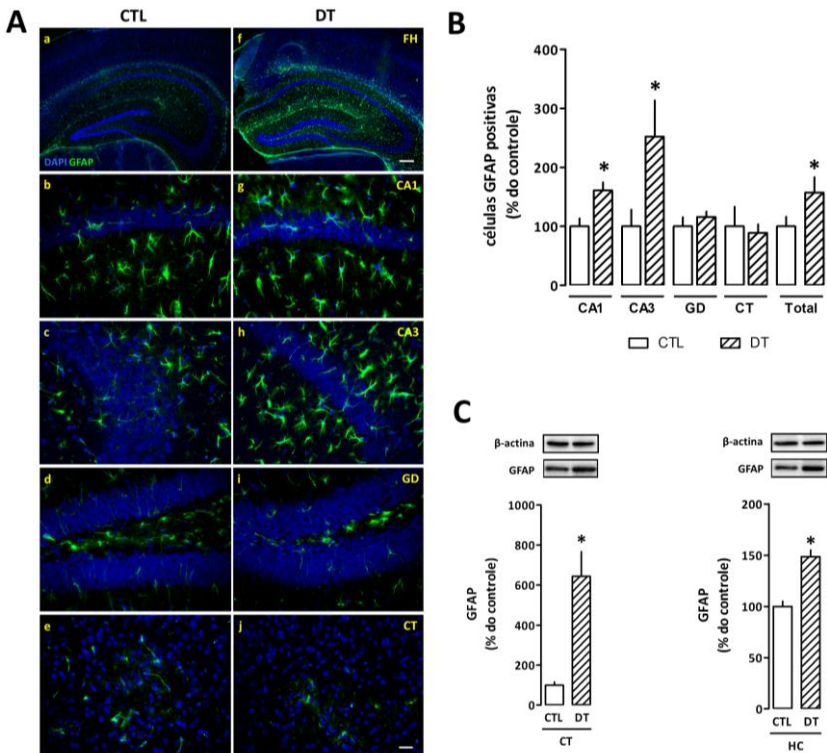


Figura 15. Avaliação da ativação e/ou migração astrocitária no córtex e hipocampo dos animais, após o estresse promovido pelo modelo de derrota social. Os cérebros foram coletados imediatamente após os animais serem submetidos ao teste de partição, 24 h após o último episódio de derrota social. (A) Imagens representativas da técnica de imunofluorescência (IF) mostrando a imunomarcagem para o GFAP no grupo de animais derrotados (DT; f-j) quando comparado aos animais do grupo controle (CTL; a - e). Aumento de 20x para a formação hipocampal (FH; a, f) e aumento de 400 x para as diferentes sub-regiões do hipocampo (CA1, CA3 e GD; b-d; g-i) e córtex (e; j) (B) Quantificação relativa da medida de densidade óptica da imunoreatividade para a GFAP avaliada por imunofluorescência nas diferentes regiões acima citadas, determinadas pela contagem do número de células positivas, sendo expressa como porcentagem do controle. O grupo total corresponde à soma da imunomarcagem nas regiões avaliadas em aumento de 400x. (C) Imagens representativas das bandas obtidas por imunodeteção para o GFAP (50 kDa) e para o controle interno β-actina (43 kDa) no córtex e hipocampo dos animais. Os gráficos representam a análise da densidade óptica da proteína GFAP, normalizada contra o controle β-actina, determinada em unidades arbitrárias, sendo expressas como porcentagem do grupo controle (CTL). CTL= grupo controle (todas as etapas sem o animal residente); DT= grupo derrotado; CT= córtex; HC= hipocampo. Escala para o aumento de 40x= 250 µm; escala para o aumento de 400x = 25 µm. Os valores estão expressos como a média + E.P.M. (3 – 4 animais por grupo). * $p \leq 0,05$; teste "t" Student quando comparado ao grupo CTL

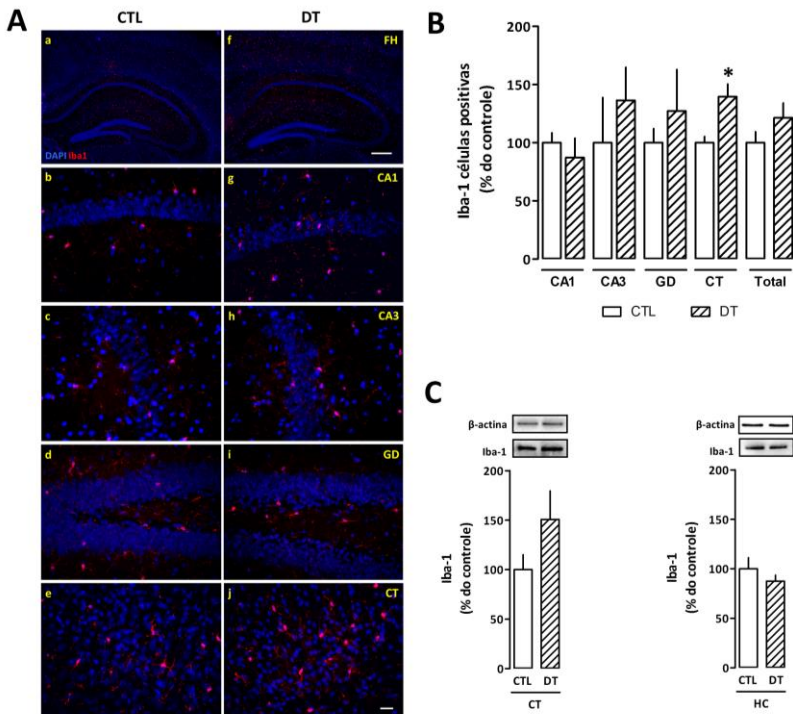


Figura 16. Avaliação da ativação e/ou migração microglial no córtex e hipocampo dos animais após um estresse promovido pelo modelo de derrota social. Os cérebros foram coletados imediatamente após os animais serem submetidos ao teste de partição, 24 h após o último episódio de derrota social. (A) Imagens representativas da técnica de imunofluorescência (IF) mostrando a imunomarcagem para o Iba-1 no grupo de animais derrotados (DT; f-j) quando comparado aos animais do grupo controle (CTL; a-e). Aumento de 20x para a formação hipocampal (FH; a,f) e aumento de 400 x para as diferentes sub-regiões do hipocampo (CA1, CA3 e GD; b-d; g-i) e córtex (e;j) (B) Quantificação relativa da medida de densidade ótica da imunoreatividade para o Iba-1 avaliada por imunofluorescência nas diferentes regiões acima citadas, determinadas pela contagem do número de células positivas, sendo expressa como porcentagem do controle. O grupo total corresponde à soma da imunomarcagem nas regiões avaliadas em aumento de 400x. (C) Imagens representativas das bandas obtidas por imunodeteção para o Iba-1 (17 kDa) e para o controle interno β -actina (43 kDa) no córtex e hipocampo dos animais. Os gráficos representam a análise da densidade óptica da proteína Iba-1, normalizada contra o controle β -actina, determinada em unidades arbitrárias, sendo expressas como porcentagem do grupo controle (CTL). CTL= grupo controle (todas as etapas sem o animal residente); DT= grupo derrotado; CT= córtex; HC= hipocampo. Escala para o aumento de 40x =250 μ m; escala para o aumento de 400x = 25 μ m. Os valores estão expressos como a média + E.P.M. (3–4 animais por grupo). * $p \leq 0,05$; teste “t” Student quando comparado ao grupo CTL

4.4 Envolvimento do receptor NK1 na ativação astrocitária decorrente do estresse social

Considerando a expressiva ativação astrocitária somado ao aumento da expressão de substância P e receptores NK1 no encéfalo de animais derrotados, bem como os dados da literatura que evidenciam a presença de receptores acoplados à proteína G nos astrócitos (TASKER *et al.*, 2012), incluindo os receptores NK1 (LAZARCZYK *et al.*, 2007), a seguinte pergunta foi incitada: há uma modulação direta dos receptores NK1 nas células astrocitárias em resposta ao estresse promovido pela derrota social?

Inicialmente, buscamos reproduzir os achados da literatura em relação à expressão dos receptores NK1. Para isso, utilizamos cultura de células astrocitárias e microgliais primárias, provenientes do córtex de ratos e através da técnica de WB avaliamos os níveis de expressão deste receptor. Corroborando os dados da literatura, observamos que há expressão de receptores NK1 tanto em astrócitos como em micróglia, como evidenciado na Figura 17.

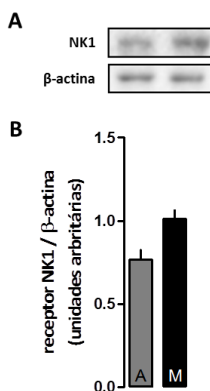


Figura 17. Análise dos níveis de expressão do receptor NK1 em culturas primárias de astrócitos e micróglia provenientes do córtex de rato. (A) Imagem representativa das bandas obtidas por imunodeteção para a proteína NK1 (54 kDa) e para o controle interno β-actina (43 kDa). (B) O gráfico representa a análise da densidade óptica da proteína NK1, normalizada contra o controle β-actina, expressa em unidades arbitrárias. A= astrócitos; M= microglia. Os valores estão expressos como a média + E.P.M. (3 culturas independentes por grupo).

Com o intuito de mimetizar a situação de estresse observada *in vivo*, em que foi constatado um aumento significativo de substância P nos cérebros dos animais derrotados, e tendo em vista a expressão de receptores NK1 nos astrócitos *in vitro*, submetemos as culturas mistas de astrócitos e micróglias a uma situação de estresse químico. Para isto, as culturas foram tratadas com SP 1 uM (TORRENS *et al.*, 1986) ou veículo (VEIC) e os marcadores de interesse foram avaliados 12 e 48 h após o tratamento. Foi realizada a dupla marcação para GFAP (marcação para astrócitos) e para receptor o NK1, através da técnica de IF. Como ilustrado na Figura 18, há expressão basal de receptor NK1 nos astrócitos, evidenciada pela coloração amarela que indica a colocalização entre a marcação GFAP (vermelho)/ NK1 (verde) (Fig. 18 d). Além disso, apesar de não termos utilizado um marcador específico para micróglia (Iba-1) neste experimento, é possível sugerir pela morfologia celular e pela marcação distinta entre as células, a expressão do receptor NK1 nas micróglias tratadas com veículo (VEIC), como indicado pelas setas amarelas (Fig. 18 a, d). Primeiramente, estes dados reforçam os resultados observados anteriormente (Figura 17) através de outra técnica. Ainda, é importante ressaltar que em condição basal há astrócitos que não expressam o receptor NK1, como indicado pelas setas brancas (Fig. 18 b, d).

Desta forma, o tratamento com a SP, após 12 h, induziu um aumento da imunomarcação positiva para NK1 (Fig. 18 e) e uma maior colocalização entre GFAP (vermelho) e NK1 (verde) (coloração amarela) (Fig. 18 h) nestas células, quando comparadas às células tratadas com VEIC (Fig. 18 d). As mesmas alterações foram observadas para o tempo de tratamento de 48 h com SP (dados não apresentados).

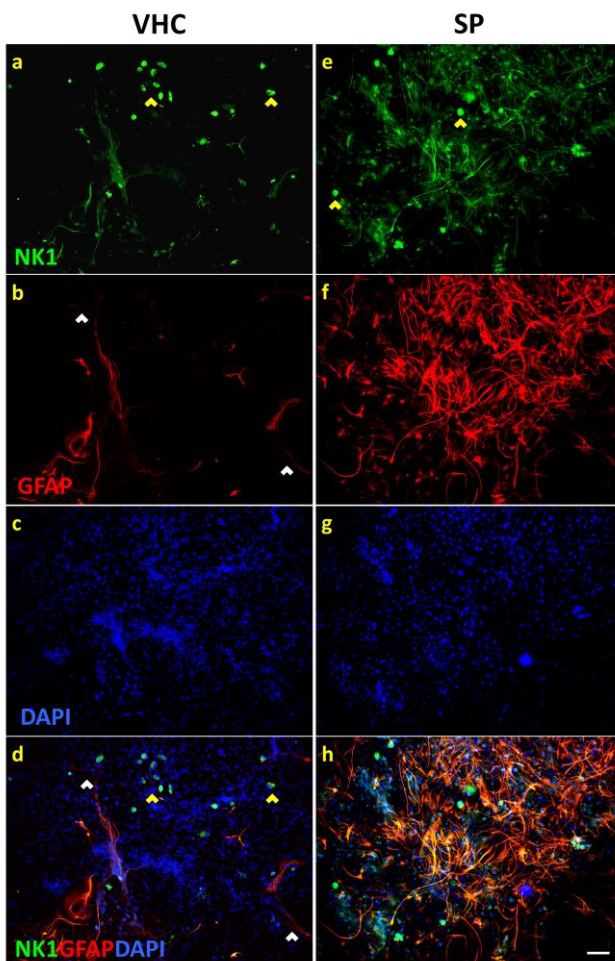


Figura 18. Avaliação do envolvimento da SP na imunomarcção para o receptor NK1 e na ativação astrocitária em células de culturas primárias mistas de astrócitos e micróglia provenientes do córtex de rato. A imunofluorescência foi realizada após 12h do tratamento das culturas com veículo (DMEM) ou substância P (1 uM). Imagens representativas da técnica de imunofluorescência (IF) mostrando a imunomarcção para NK1 (verde), para GFAP (vermelho) e a marcação para núcleo (DAPI; azul), após o tratamento com SP (e - h) quando comparado ao tratamento com veículo (a - d) nas culturas de célula gliais. Setas brancas: imunomarcção somente para GFAP; Setas amarelas: indicativas de imunomarcção para NK1 na micróglia; VEIC= veículo, SP= substância P. Escala = 100 um; (n= 3-4/ culturas independentes por grupo).

Os dados obtidos nas culturas de células (*in vitro*) nos conduziram à investigação da expressão dos receptores NK1 nas células astrocitárias nos cérebros dos camundongos submetidos ao modelo de derrota social (*in vivo*), sendo avaliada a colocalização entre os marcadores GFAP e NK1 no córtex e hipocampo desses animais. A Figura 19 A destaca a expressão basal de GFAP e NK1 nos animais controle (CTL), ou seja, não derrotados. Nossos resultados revelaram que o protocolo de estresse social induziu um aumento da expressão de GFAP (Fig. 19A, e) – confirmando os resultados apresentados na Fig. 15 – e também um aumento de marcação para o NK1 – reforçando os dados de WB apresentados na Fig. 14 – nos animais derrotados. Entretanto, a análise dos cortes histológicos do hipocampo conduziu a uma nova perspectiva para este resultado, quando observamos que também ocorre um aumento na colocalização entre os dois marcadores nos cérebros dos animais derrotados (DT), como mostrado na Fig. 19A. Uma análise mais minuciosa revelou que nos cérebros dos animais controles (CTL), principalmente nas sub-regiões CA3 e GD, houve uma expressão de NK1 nos astrócitos (indicado pelas setas amarelas), e auxiliados pela morfologia celular, possivelmente na micróglia (indicado pelas setas azuis). Ainda, a presença de imunomarcação para o receptor NK1 circundando os corpos celulares da camada piramidal e granular de neurônios (indicados pelas setas brancas), evidencia a sua expressão nestas células (Fig. 19A; CTL). Provavelmente, nosso achado mais importante seja o representado na Figura 19A; DT, que mostra um aumento da expressão de NK1 nos astrócitos, porém a ausência quase que completa da marcação para este receptor nos neurônios.

Com o auxílio do programa StrataQuest® foi realizada uma análise parcial (na sub-região CA3) de citometria de tecido nas fatias do cérebro destes animais e encontramos que, em condições basais (CTL), considerando a população astrocitária como 100%, há uma marcação para o receptor NK1 nestas células de 35,13% (Fig. 19 B, à esquerda). Por outro lado, e corroborando os achados moleculares, após a submissão ao estresse social nos animais, a distribuição deste receptor aumenta consideravelmente nas células astrocitárias, sendo detectada uma marcação de 50,32% para NK1, colocalizando com células GFAP positivas (Fig. 19 B, à direita).

Este conjunto de resultados sugere a importância da SP na modulação das células gliais, principalmente nos astrócitos. Deste modo, até o presente momento, podemos inferir que o

estresse induz um aumento da liberação de substância P, e esta é capaz de atuar sobre o seu principal receptor, o NK1, que está presente nos astrócitos, na micróglia e nas células neuronais, possivelmente induzindo ativação e/ou migração das células gliais. Ainda, parece ocorrer a redistribuição deste receptor nestas células, que, ao menos parcialmente, pode ser resultante dos mecanismos acima citados. Dada à compreensão parcial do envolvimento das células gliais – primariamente os astrócitos –, nossa próxima pergunta teve como alvo principal os potenciais efeitos nocivos que este aumento de liberação de SP poderia causar nos neurônios.

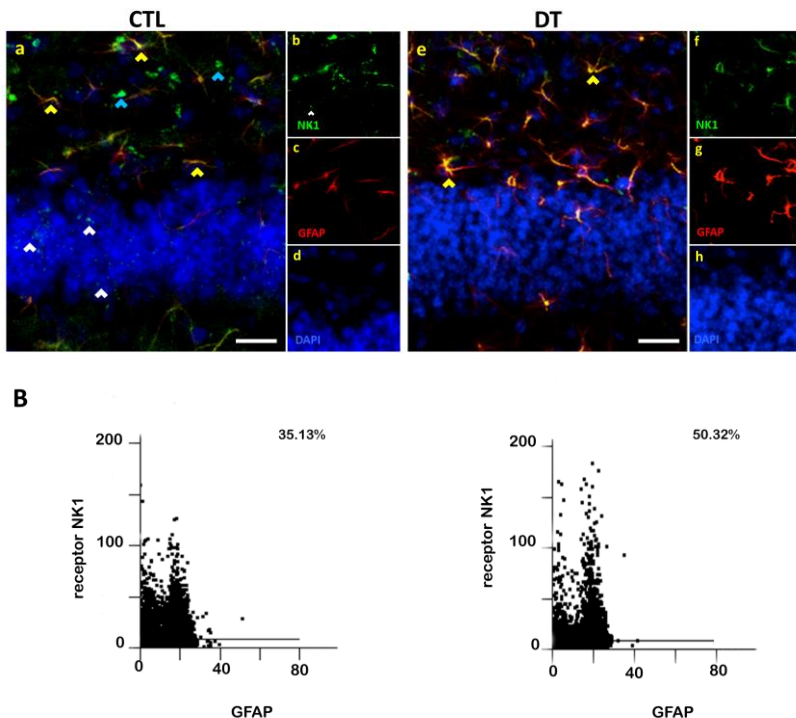


Figura 19. Análise da colocalização para a expressão do receptor NK1 e para a ativação e/ou migração astrocitária no hipocampo dos animais, após um estresse promovido pelo modelo de derrota social. Os cérebros foram coletados imediatamente após os animais serem submetidos ao teste de partição, 24 h após o último episódio de derrota social. (A) Imagens representativas da técnica de imunofluorescência (IF) mostrando a marcação para NK1 (verde) e GFAP (vermelho) no grupo de animais derrotados (DT; e - g) quando comparado aos animais do grupo controle (CTL; a - c) na sub-região CA3 e GD do hipocampo. O DAPI foi utilizado para marcação do núcleo (azul; d,h). Setas brancas: imunomarcacão para NK1 na camada de neurônios; Setas amarelas: indicativas de imunomarcacão para NK1 nos astrócitos; Setas azuis: indicativas de imunomarcacão para NK1 na microglia. (B) Os gráficos representam a análise de colocalização - equivalente a de citometria de tecido - da sub-região CA3 e GD do hipocampo do grupo controle (esquerda) e do grupo derrotado (direita). CTL= grupo controle (todas as etapas sem o animal residente); DT= grupo derrotado. Escala = 20 μ m. (n=3 animais por grupo).

4.5 A importância da substância P para a neurotoxicidade na derrota social

Ainda buscando compreender os mecanismos neuropatológicos envolvidos na resposta à derrota social, principalmente nos neurônios, avaliamos a marcação para morte neuronal através da técnica histoquímica de Fluoro-Jade B (SCHMUED & HOPKINS, 2000). Como mostrado na Figura 20, o protocolo de estresse social adotado neste trabalho foi capaz de promover um aumento da marcação de morte em células neuronais no hipocampo e córtex dos animais. Estas alterações são observadas nas imagens representativas e ocorrem em regiões específicas do hipocampo, como a sub-região CA3 (Fig. 20 f) e o giro denteado (Fig. 20 g), mas não na região CA1 (Fig. 20 e) dos animais derrotados (DT) quando comparados às mesmas regiões dos animais do grupo controle (CTL). Este resultado indica o potencial efeito neurotóxico, em parte, induzido pelo aumento excessivo de SP induzido pelo estresse do modelo de derrota social.

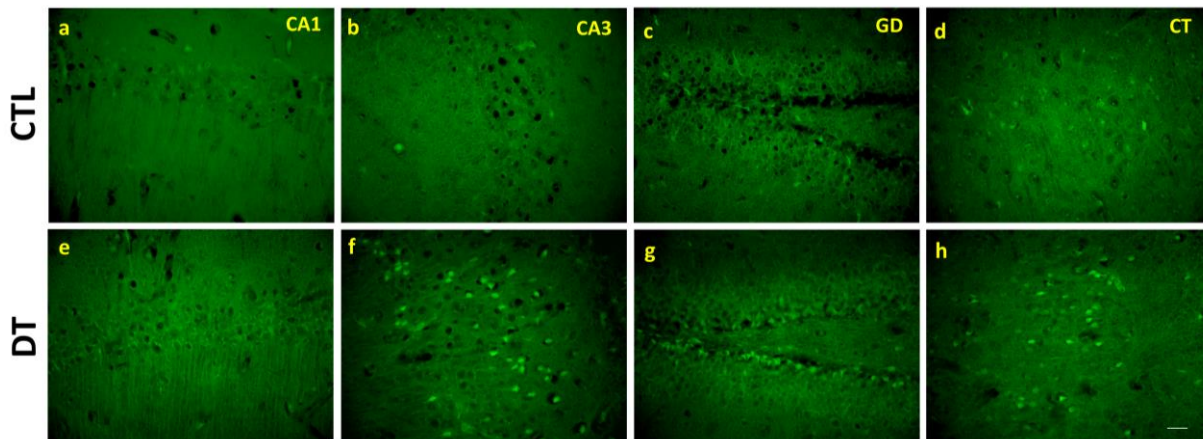


Figura 20. Avaliação histoquímica de morte neuronal no córtex e hipocampo dos animais após o estresse promovido pela derrota social. Os cérebros foram coletados imediatamente após os animais serem submetidos ao teste de partição, 24 h após o último episódio de derrota social. Imagens representativas da marcação histoquímica para Fluoro-Jade[®] B (FJB), um marcador de morte neuronal (coloração verde fluorescente) nas sub-regiões do hipocampo CA1, CA3, GD e ainda no córtex em uma magnificação de 400x. Escala = 25µm. Grupo de animais controle (CTL, a - d; todas as etapas sem o animal residente) e grupo de animais derrotado (DT; e - h). (n=3/grupo).

4.6 Bloqueio da resposta comportamental defensiva no modelo de derrota social pelo antagonismo do receptor NK1

Nossos resultados anteriores evidenciam o envolvimento do sistema taquicinérgico nas respostas comportamentais defensivas promovidas pelo estresse social, de maneira detalhada: o aumento de SP no córtex e hipocampo; a redistribuição dos receptores NK1; e o potencial efeito neuroinflamatório e neurotóxico destas alterações induzidas pelo estresse. Tendo como base esses resultados, decidimos investigar se o bloqueio do receptor NK1 seria capaz de impedir as respostas comportamentais defensivas induzidas pelo protocolo de estresse social. Para isto, foram utilizadas as doses de 1, 3 e 10 mg/kg de L-703,606, um antagonista seletivo e não peptídico do receptor NK1, administrado por via intraperitoneal 30 min antes da realização do teste de partição (Fig. 21). O gráfico apresentado na Figura 21A mostra que os animais derrotados que receberam o antagonista do receptor NK1, na dose de 10 mg/kg i.p., apresentaram um aumento do tempo de aproximação na barreira, quando comparado ao grupo de animais derrotados que recebeu apenas veículo (VEIC) [$F_{(3,35)} = 4,730$; $p = 0,0071$], e embora não significativa, uma redução do comportamento de avaliação de risco na mesma dose [$F_{(3,35)} = 2,691$; $p = 0,0612$] (Figura 21B). De maneira complementar, também pode ser observada a redução significativa no comportamento de escavação da serragem nas doses de 3 e 10 mg/kg ($F_{(3,35)} = 8,161$; $p = 0,0003$) (Figura 21C), um parâmetro indicador de exploração. Adicionalmente, as imagens do percurso dos animais durante o teste de partição também foram analisadas com o auxílio do programa Anymaze®, sendo possível a obtenção de um mapa ocupacional para cada grupo. As cores quentes, ao contrário das cores frias, denotam as regiões de maior permanência do grupo de animais avaliado. Corroborando, a Figura 22 apresenta o mapa ocupacional do grupo, referente aos gráficos da Fig. 21A, podendo ser visualizado o maior tempo na barreira, ou próximo a ela, do animal tratado com L-703, 606 na dose de 10 mg/kg, quando comparado ao animal VEIC. Os comportamentos observados para os animais tratados com o L-703, 606 (10 mg/kg; i.p.) é muito semelhante ao observado para os animais controle, ou seja, não estressados (Fig. 8 A e B). Este resultado indica que o bloqueio do receptor NK1 é

capaz de impedir a resposta comportamental defensiva, reforçando o papel determinante da SP neste modelo.

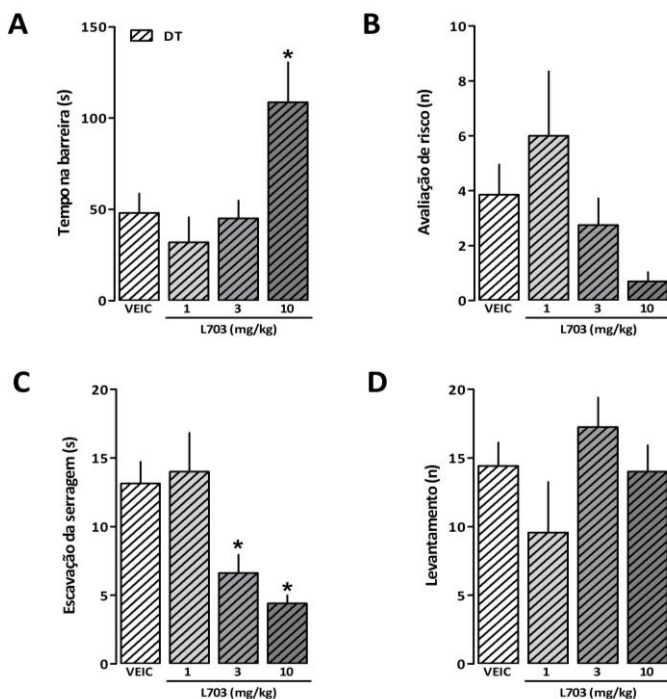


Figura 21. Determinação do efeito do antagonista do receptor NK1 (L-703, 606) sobre a resposta comportamental defensiva dos animais, após um estresse promovido pelo modelo de derrota social. Os animais foram submetidos ao protocolo de derrota social (sessões de treino por 3h, 3 dias consecutivos) e 30 min antes da avaliação comportamental no teste de partição (24h após a última sessão de treino) foram tratados via intraperitoneal com veículo (DMSO 10%) ou o antagonista do receptor NK1 (L-703,606) nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg. (A) Tempo em segundos de aproximação na barreira; (B) número de comportamentos de avaliação de risco; (C) tempo em segundos de escavação da serragem e (D) frequência de levantamentos. DT= animais derrotados; VEIC= veículo; L703= antagonista do receptor NK1. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n =7-14 animais por grupo). * $p \leq 0,05$; quando comparado ao grupo veículo (ANOVA de 1 via seguida pelo teste de Dunnett's).

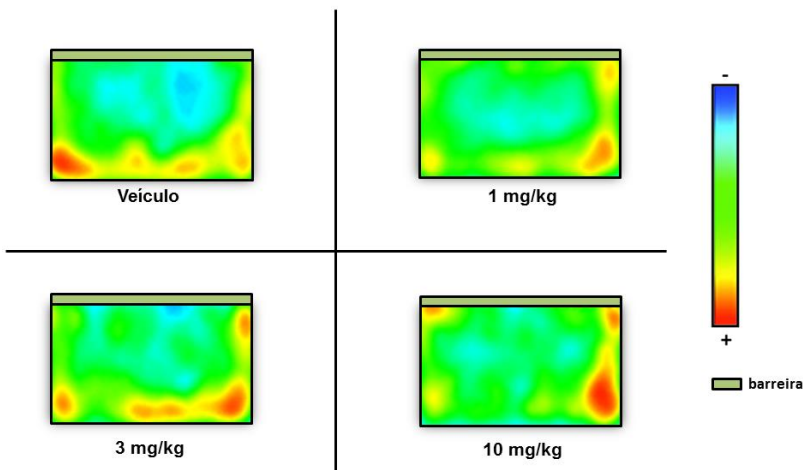


Figura 22. Representação gráfica (mapa ocupacional) do efeito do antagonista do receptor NK1 (L-703, 606) sobre o tempo de aproximação na barreira durante o teste de partição, após um estresse promovido pelo modelo de derrota social. Os animais foram submetidos ao protocolo de derrota social (sessões de treino por 3h, 3 dias consecutivos) e 30 min antes da avaliação comportamental no teste de partição (24h após a última sessão de treino) foram tratados via intraperitoneal com veículo (DMSO 10%) ou o antagonista do receptor NK1 (L-703,606) nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg. Mapa ocupacional do teste de partição, representativo do grupo, evidenciando e ilustrando a resposta comportamental defensiva do tempo de aproximação na barreira. A escala de cores para o mapa de ocupação denota a intensidade da ocupação: cores mais frias indicam menor ocupação, enquanto que as cores mais quentes indicam maior ocupação.

Para descartar um possível resultado falso positivo, por uma interferência de alteração na locomoção dos animais decorrente do tratamento farmacológico, também avaliamos através do programa Anymaze® parâmetros locomotores durante o teste de partição. Os dados obtidos revelam que o tratamento farmacológico com o L-703, 606, realizado antes do teste de partição, não altera a distância percorrida ($F_{(3,35)} = 0,9498$; $p = 0,4272$) (Fig. 23A) e nem a velocidade média ($F_{(3,35)} = 0,9316$; $p = 0,4357$) (Fig. 23B) de nenhum dos grupos (1, 3 ou 10 mg/kg), em comparação ao grupo VEIC.

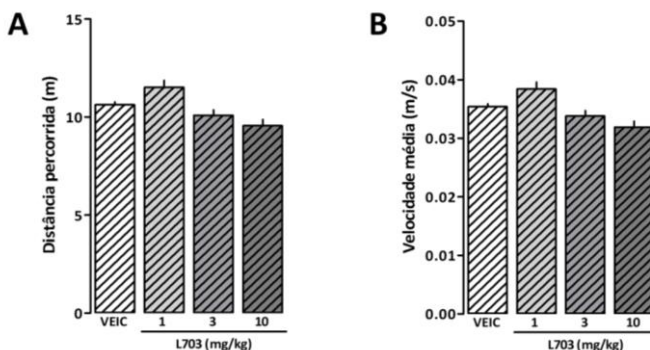


Figura 23. Efeito do tratamento com antagonista do receptor NK1 (L-703, 606) sobre a locomoção dos animais, após um estresse promovido pelo modelo de derrota social. Os animais foram submetidos ao protocolo de derrota social (sessões de treino por 3h, 3 dias consecutivos) e 30 min antes da avaliação comportamental no teste de partição (24h após a última sessão de treino) foram tratados via intraperitoneal com veículo (DMSO 10%) ou o antagonista do receptor NK1 (L-703,606) nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg. (A) Distância percorrida em metros e (B) velocidade média em metros/segundo. VEIC= veículo; L703= antagonista do receptor NK1. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n =7-14 animais por grupo). * $p \leq 0,05$; quando comparado ao grupo veículo (ANOVA de 1 via seguida pelo teste de Dunnett's).

Adicionalmente, avaliamos o efeito *per se* do L-703, 606 (10 mg/kg; i.p.) no teste de realocação de objetos, a fim de investigar um possível efeito amnésico deste antagonista. Nossos resultados mostram que os animais que receberam, antes da sessão treino com os objetos, a dose de 10 mg/kg de L-703,606, apresentaram durante a sessão de teste, um índice de exploração do objeto realocado maior (aproximadamente 75%) do que o índice apresentado para o objeto familiar (o objeto que permaneceu na mesma posição durante a sessão de treino e teste) (Apêndice A). Os índices de exploração foram muito similares aos apresentados pelo grupo de animais que recebeu veículo, e indica que a memória dos animais não é afetada pelo tratamento, descartando qualquer possível efeito amnésico induzido pela droga no resultado obtido de avaliação das repostas comportamentais (Fig. 21).

4.7 Relevância das alterações moleculares induzidas pelo modelo de derrota social e efeito benéfico do antagonismo do receptor NK1

Nesta etapa do estudo, visto que, o tratamento com o antagonista do receptor NK1, o L-703, 606, impediu o conjunto de respostas comportamentais defensivas exacerbadas nos animais derrotados, avaliamos os possíveis efeitos benéficos do bloqueio dos receptores NK1 sobre alvos moleculares de extrema relevância e contribuição para o modelo.

4.7.1 Alterações dos níveis de corticosterona e da expressão de GR induzidas pelo estresse social e pelo tratamento com L-703, 606

Está bem estabelecido que frente a situações de estresse – tanto em humanos quanto em modelos animais – ocorre uma resposta rápida do organismo, culminando no aumento dos níveis de cortisol/corticosterona no sangue (ARMARIO *et al.*, 1996; RABASA *et al.*, 2011), decorrente da ativação do eixo HPA (conforme descrito no item 1.2). Ainda, se o evento estressor é persistente, ocorre uma modulação no mecanismo de retroalimentação do eixo HPA, levando a uma alteração na expressão de receptores glicocorticoides (GR) (YEHUDA *et al.*, 1991). Sendo assim, consideramos importante avaliar as possíveis alterações induzidas pelo modelo de derrota social nos níveis de corticosterona plasmática e de expressão de GR, na tentativa de caracterizar a modulação neuroendócrina promovida por este protocolo além do efeito da modulação do sistema taquicínérgico sobre esta modulação. A Figura 24 ilustra a concentração de corticosterona em ng/mL no plasma dos animais. Como pode ser observado, não houve diferença nos níveis de corticosterona entre os animais do grupo controle (CTL) e do grupo derrotado (DT) [$t(6)=0,1097$; $p= 0,9162$]. Entretanto, é notável a redução – de aproximadamente 50% – dos níveis de corticosterona plasmática provocada pela administração do antagonista do receptor NK1, o L-703, 606, em relação aos demais grupos (CTL e DT). Este resultado ressalta a participação da SP na modulação da liberação de corticosterona, e sugere, ao menos em parte, uma conexão entre estes eventos e a redução dos comportamentos defensivos,

observada durante o teste de partição, para os animais que foram tratados com o antagonista NK1.

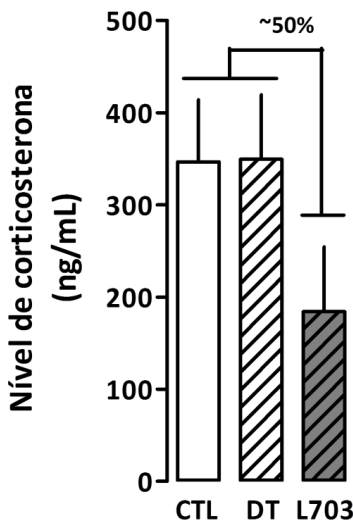


Figura 24. Envolvimento do receptor NK1 na modulação dos níveis de corticosterona plasmática dos animais, após um estresse promovido pelo modelo de derrota social. Os animais foram submetidos ao protocolo de derrota social (sessões de treino por 3h, 3 dias consecutivos) e 30 min antes da avaliação comportamental no teste de partição (24h após a última sessão de treino) foram tratados via intraperitoneal com veículo (DMSO 10%) ou o antagonista do receptor NK1 (L-703,606) na dose de 10 mg/kg. O plasma foi coletado 30 min após os animais serem submetidos ao teste de partição. O gráfico representa o nível de corticosterona plasmática em ng/ml dos animais do grupo controle (CTL), dos animais do grupo derrotado (DT) e dos animais que foram tratados com o antagonista do receptor NK1 (L-703). CTL= controle (todas as etapas sem o animal residente); DT= derrotado; L703= antagonista do receptor NK1. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n =3-4 animais por grupo) (ANOVA de duas via seguida pelo teste de Bonferroni).

A Figura 25 mostra a expressão do receptor GR no córtex e hipocampo dos animais submetidos ao protocolo, através da técnica de IF e WB. É possível observar que o estresse social foi capaz de promover uma redução considerável na expressão de GR no córtex (Fig. 25A c) e na sub-região CA3 e do hipocampo (Fig.

25A d) dos animais derrotados (DT), quando comparados aos animais controles (CTL; Fig. 25A a -b). Ainda, o bloqueio do receptor NK1 realizado através da administração do L-703, 606 promove uma melhora destas alterações, nas mesmas regiões mencionadas (L-703; Fig. 25A e - f). Corroborando os achados descritos acima, na Fig. 25B observa-se uma redução, embora não significativa, da expressão de GR no grupo de animais DT quando comparado ao grupo CTL, na região do córtex e do hipocampo, pela técnica de WB. Interessantemente, o tratamento com o antagonista do receptor NK1 (L703) reestabelece a expressão de GR na região do córtex (Fig. 25B; CT), e se mantém inalterada no hipocampo (Fig. 25B; HP), em relação ao grupo DT. O presente conjunto de resultados nos sugere que o estresse promovido pelo modelo de derrota social parece atuar na modulação do eixo HPA, alterando a expressão de GR e evidencia a participação do sistema taquicinérgico na modulação deste eixo provocando alterações na liberação de corticosterona e na expressão de GR.

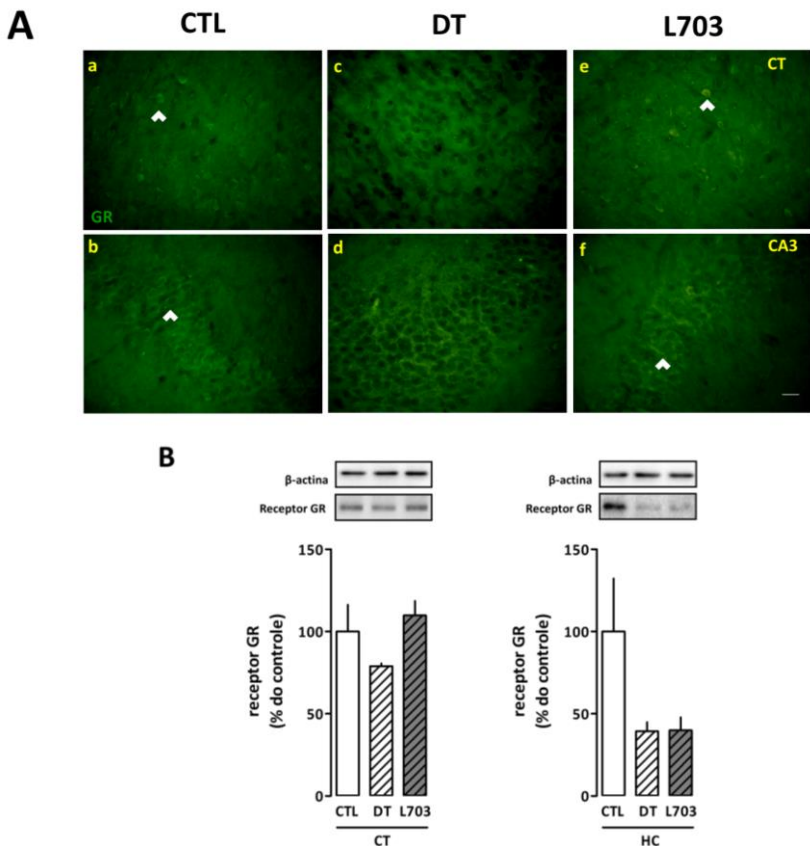


Figura 25. Efeito do tratamento com antagonista do receptor NK1 (L-703, 606) sobre a expressão do receptor de glicocorticoide (GR) no hipocampo e córtex dos animais, após um estresse promovido pelo modelo de derrota social. Os animais foram submetidos ao protocolo de derrota social (sessões de treino por 3h, 3 dias consecutivos) e 30 min antes da avaliação comportamental no teste de partição (24h após a última sessão de treino) foram tratados via intraperitoneal com veículo (DMSO 10%) ou o antagonista do receptor NK1 (L-703,606) na dose de 10 mg/kg. Os cérebros foram coletados imediatamente após os animais serem submetidos ao teste de partição. (A) Imagens representativas da imunomarcagem para o receptor de glicocorticoide – GR (verde; indicada pelas setas brancas) no grupo de animais controle (CTL; a - b.), no grupo de animais derrotado (DT; c-d) e no grupo de animais tratados com o antagonista do receptor NK1 (L-703; e-f) na região do córtex e na sub-região CA3 do hipocampo, em um aumento de 400x. (B) Imagens representativas das bandas obtidas por imunodeteção (WB) para a proteína GR (94 kDa) e para o controle interno β-actina (43 kDa) no córtex e hipocampo dos animais. Os gráficos representam a análise da densidade óptica da proteína GR, normalizada contra o controle β-actina, determinada em unidades arbitrárias, sendo expressas como porcentagem do grupo controle (CTL). CTL= grupo controle (todas as etapas sem o animal residente); DT= grupo derrotado; L703= grupo tratado com o antagonista do receptor NK1; CT= córtex; HC= hipocampo. Escala= 25 um. Os valores estão expressos como média +E.P.M. (n =3-4 animais por grupo) (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni).

4.7.2 Marcadores de neurogênese

Como mostrado no item 4.5, o estresse promovido pela derrota social levou a um efeito deletério evidenciado pela morte neuronal, sobretudo nos neurônios hipocampais, na sub-região CA3 e no giro denteado do hipocampo, sendo essas estruturas intimamente relacionadas com o processo de neurogênese (VAN PRAAG *et al.*, 2002). Baseados nestes fatos, buscamos avaliar marcadores de neurogênese nas fatias obtidas de encéfalos dos animais, após o estresse promovido pelo modelo de derrota social e, também, o efeito do tratamento com o L703, 606 sobre estes marcadores. A expressão do fator neurotrófico BDNF vem sendo apontada como uma ferramenta fundamental no estudo de transtornos psiquiátricos (HU & RUSSEK, 2008), e tem sido demonstrado que fatores neurotróficos como o BDNF podem ser modulados por experiências de estresse agudo ou crônico (CALABRESE *et al.*, 2009).

A Figura 26 evidencia o efeito do estresse, assim como do tratamento realizado com o antagonista do receptor NK1, sobre a expressão do marcador BDNF. As imagens representativas de IF das sub-regiões CA3 e GD do hipocampo (Fig. 26A) sugerem que o estresse induz uma redução na imunomarcagem para BDNF (indicada pelas setas brancas), observada para o grupo de animais derrotados (DT; Fig. 26A c, d) quando comparados ao grupo controle (CTL; Fig. 26A a, b). Em contraste, o tratamento com o antagonista do receptor NK1 parece promover o aumento da expressão deste marcador em relação ao grupo derrotado (L703; Fig. 26A e, f). Com o intuito de confirmar quantitativamente estes resultados, foi realizada a análise de WB. A Fig. 26B mostra que os animais derrotados apresentam uma redução dos níveis de expressão de BDNF no córtex, sem aparentemente alterar a expressão deste marcador no hipocampo. Em relação ao bloqueio dos receptores NK1 pelo tratamento com L-703, 606, os achados são ainda mais interessantes. Embora não significativo, há uma tendência a um aumento da expressão de BDNF no córtex, em comparação ao grupo DT, porém no hipocampo há um aumento expressivo - aproximadamente 3x mais que os níveis basais – dos níveis de expressão de BDNF em comparação com o grupo controle (CTL) e o grupo derrotado (DT).

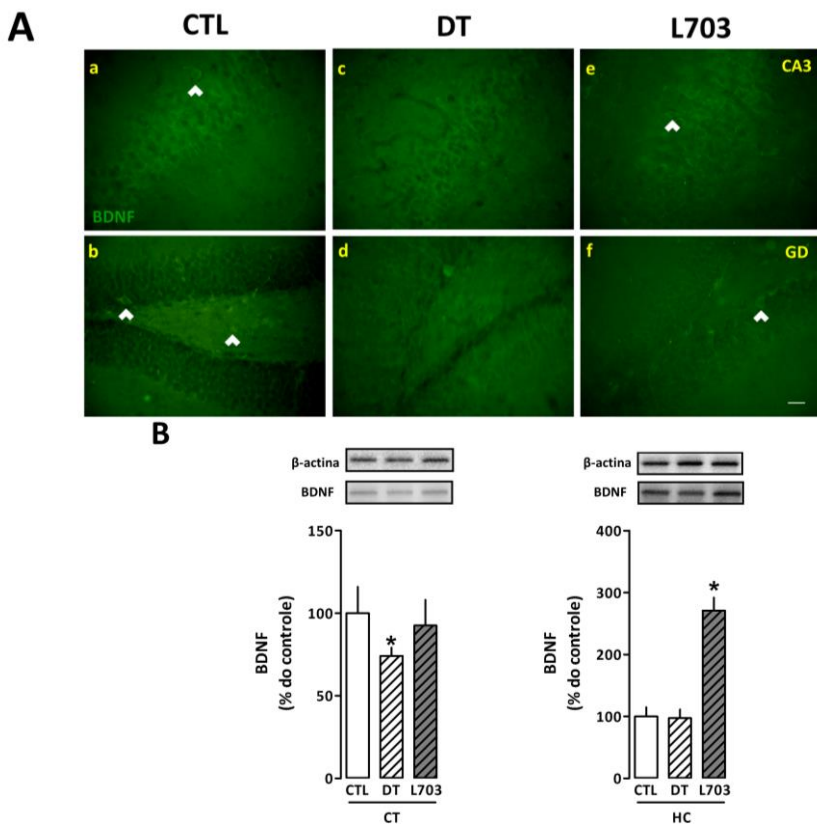


Figura 26. Envolvimento do receptor NK1 na indução da liberação e/ou produção de BDNF no hipocampo e córtex dos animais após um estresse promovido pelo modelo de derrota social. Os animais foram submetidos ao protocolo de derrota social (sessões de treino por 3h, 3 dias consecutivos) e 30 min antes da avaliação comportamental no teste de partição (24h após a última sessão de treino) foram tratados via intraperitoneal com veículo (DMSO 10%) ou o antagonista do receptor NK1 (L-703,606) na dose de 10 mg/kg. Os cérebros foram coletados imediatamente após os animais serem submetidos ao teste de partição. (A) Imagens representativas da técnica de imunofluorescência (IF) mostrando a marcação para BDNF (verde; indicada pelas setas brancas) grupo de animais controle (CTL; a-d), no grupo de animais derrotado (DT; b, e) e no grupo tratado com o antagonista NK1 (L-703; c, f) nas sub-regiões CA3 e GD do hipocampo, em um aumento de 400x. (B) Imagens representativas das bandas obtidas por imunodeteção (WB) para a proteína BDNF (12 kDa) e para o controle interno β-actina (43 kDa) no córtex e hipocampo dos animais. Os gráficos representam a análise da densidade óptica da proteína BDNF, normalizada contra o controle β-actina, determinada em unidades arbitrárias, sendo expressos como porcentagem do grupo controle (CTL). CTL= grupo controle (todas as etapas sem o animal residente); DT= grupo derrotado; L703= grupo tratado com o antagonista do receptor NK1; CT= córtex; HC= hipocampo. Escala= 25 um. Os valores estão expressos como a média ± E.P.M. (N = 3-5/grupo). * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo controle e # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo derrotado (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni).

A Figura 27 representa as imagens das análises realizadas nas fatias de cérebro para a marcação de espinofilina, um marcador de sinapses (ALLEN, OJIMET, GREENGARD, 1997) nas sub-regiões CA3 e do GD do hipocampo, através da técnica de IF. De modo similar ao observado anteriormente, na expressão de BDNF (Fig. 26A), o estresse induzido pelo modelo de derrota social conduz a uma redução expressiva da expressão de espinofilina nos animais derrotados (DT; b,e) quanto comparado ao grupo controle (CTL; a,d). Ademais, a expressão de espinofilina parece aumentar após o tratamento com o antagonista do receptor NK1 (L703; c,f), sendo semelhante ao grupo controle (CTL; a,d). Em resumo, os dados obtidos após a avaliação de diferentes marcadores de neurogênese sugerem o estresse promovido pelo modelo de derrota social interfere no processo de neurogênese e ainda, que o bloqueio dos receptores NK1 - na dose de 10 mg/kg – é capaz de reverter a condição de prejuízo na neurogênese causado pelo estresse social.

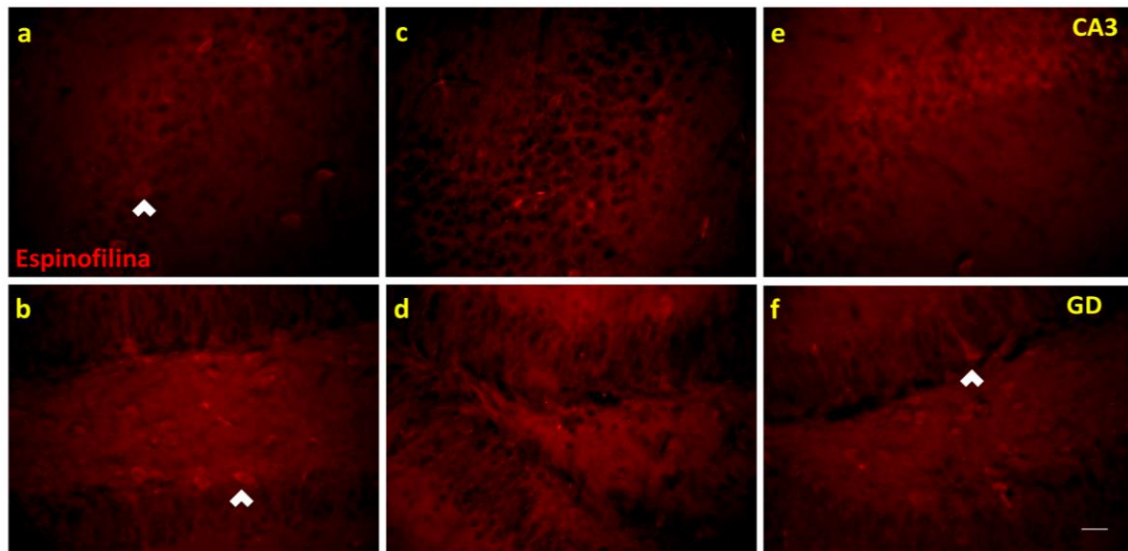


Figura 27. Envolvimento do receptor NK1 na expressão de espinofilina em sub-regiões do hipocampo após um estresse promovido pelo modelo de derrota social. Os animais foram submetidos ao protocolo de derrota social (sessões de treino por 3h, 3 dias consecutivos) e 30 min antes da avaliação comportamental no teste de partição (24h após a última sessão de treino) foram tratados via intraperitoneal com veículo (DMSO 10%) ou o antagonista do receptor NK1 (L-703,606) na dose de 10 mg/kg. Os cérebros foram coletados imediatamente após os animais serem submetidos ao teste de partição. Imagens representativas da técnica de imunofluorescência (IF) mostrando a marcação para espinofilina (vermelho; indicada pelas setas brancas) no grupo de animais controle (CTL; a, d), nos animais derrotados (DT; b, e) e no grupo de animais tratados com o antagonista NK1 (L-703; c, f) na sub-região CA3 e do GD do hipocampo, em um aumento de 400x. Escala= 25 um. CTL= grupo controle (todas as etapas sem o animal residente); DT= grupo derrotado; L703= grupo tratado com o antagonista do receptor NK1; GD = Giro denteado.

4.7.3 Efeito do tratamento com L-703, 606 sobre a ativação astrocitária e a modulação do sistema taquicinérgico induzidos pelo estresse decorrente do modelo de derrota social

Considerando nossos resultados anteriores, que mostraram que o estresse dependente do modelo de derrota social induziu um aumento na ativação e/ou migração astrocitária (Fig. 15; Fig. 19A), decidimos primeiramente verificar o efeito do tratamento com o antagonista do receptor NK1 sobre esta resposta. Realizamos a imunomarcção para o GFAP, tanto por IF, quanto por WB, em tecidos cerebrais coletados imediatamente após o teste de partição. A Figura 28A destaca o aumento da expressão de GFAP nos animais derrotados (DT) quando comparado ao grupo controle (CTL) - confirmando nossos resultados prévios. O bloqueio do receptor NK1, pela administração do L-703, 606, antes do teste de partição, reduziu a imunomarcção para GFAP no hipocampo dos animais tratados, quando comparados ao grupo derrotado (DT). Corroborando este achado, a Fig. 28B evidencia, através da análise de WB, o aumento dos níveis de expressão para o GFAP no córtex e hipocampo dos animais derrotados, e a redução significativa destes níveis na região do córtex dos animais tratados com o antagonista L-703, 606, quando comparados ao grupo derrotado (DT). Não houve nenhuma alteração significativa da expressão de GFAP no hipocampo dos animais tratados (L-703, 606), em comparação aos DT, porém é importante ressaltar que a análise mais detalhada através da técnica IF revelou diferenças entre as sub-regiões do hipocampo, incluindo a região CA3 (Fig. 28A) e o GD (dados não apresentados).

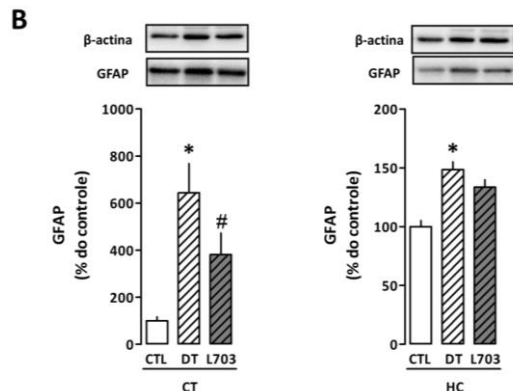
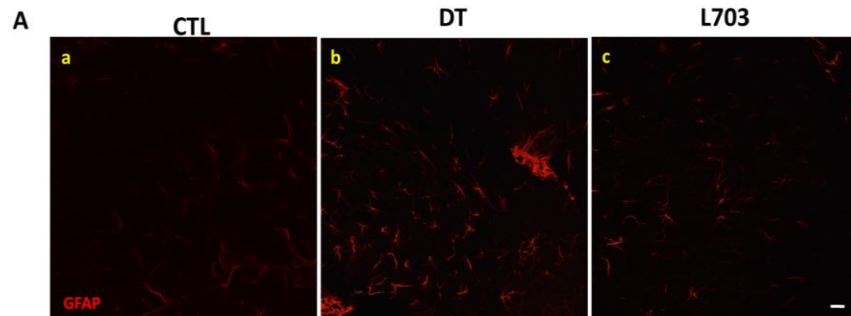


Figura 28. Efeito do tratamento com antagonista do receptor NK1 (L-703, 606) sobre a ativação e/ou migração astrocitária, após um estresse promovido pelo modelo de derrota social. Os animais foram submetidos ao protocolo de derrota social (sessões de treino por 3h, 3 dias consecutivos) e 30 min antes da avaliação comportamental no teste de partição (24h após a última sessão de treino) foram tratados via intraperitoneal com veículo (DMSO 10%) ou o antagonista do receptor NK1 (L-703,606) na dose de 10 mg/kg. Os cérebros foram coletados imediatamente após os animais serem submetidos ao teste de partição. (A) Imagem representativa da técnica de imunofluorescência (IF) para o marcador GFAP na sub-região CA3 do hipocampo, em um aumento de 400 vezes; Escala =20 um. (B) Imagens representativas das bandas obtidas por imunodeteccção para a proteína GFAP (50 kDa) e para o controle interno β-actina (43 kDa) no córtex e hipocampo dos animais. Os gráficos representam a análise da densidade óptica da proteína GFAP, normalizada contra o controle β-actina, determinada em unidades arbitrárias, sendo expressos como porcentagem do grupo controle (CTL). CTL= grupo controle (todas as etapas sem o animal residente); DT= grupo derrotado; L703= grupo derrotado, tratado com o antagonista do receptor NK1; CT= córtex; HC= hipocampo. Os valores estão expressos como a média + E.P.M. (N = 3/grupo). *p ≤ 0,05 quando comparado ao grupo CTL e # p< 0,05 quando comparado ao grupo DT (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni).

Por fim, na compreensão de como o tratamento com um antagonista NK1 pode alterar os parâmetros já observados neste estudo, e com base nos dados supracitados e nos dados apresentados na sessão de Resultados (item 4.4; Fig.19), foi realizada uma dupla marcação (colocalização) entre GFAP e NK1 por IF e posterior análise parcial em citometria de tecido nas fatias do cérebro dos animais que receberam o tratamento com o L-703, 606.

Uma análise detalhada dos cortes revelou que nos cérebros dos animais tratados com o L-703, 606, principalmente nas sub-regiões CA3 e GD do hipocampo, há uma redução expressiva de NK1 nos astrócitos - indicado pelas setas amarelas: colocalização; e pelas setas azuis: células que expressam somente GFAP – diferindo substancialmente do grupo derrotado sem tratamento (Fig. 29A; DT). Ainda, a presença de imunomarcacão para o receptor NK1 circundando os corpos celulares da camada piramidal e granular de neurônios (indicados pelas setas brancas), evidencia que o tratamento com o antagonista NK1 parece favorecer a distribuição basal deste receptor nestas células (Fig. 29A), em relação ao grupo derrotado (DT), assemelhando-se ao perfil observado no grupo controle CTL, descritos na Fig. 29A.

Como já mencionado anteriormente, o estresse promovido pelo modelo de derrota social induziu um aumento considerável na distribuição do receptor NK1 nas células astrocitárias – DT: 50,32% e CTL: 35,13% de colocalização – analisadas por citometria de tecido (Fig. 19B). Notavelmente, com o bloqueio do receptor NK1, após uma única administração do antagonista L-703, 606, houve uma redução considerável na marcação para NK1 em células astrocitárias (Fig.29 A e B), em outras palavras, na colocalização entre NK1 e GFAP. Isto se torna mais evidente quando observamos a marcação para este receptor nas células GFAP positivas (35,13%) no hipocampo dos animais tratados (Fig. 29B), que agora se assemelha à marcação encontrada para o grupo controle.

Ainda na tentativa de elucidar o efeito do tratamento com o L-703, 606 sobre o sistema taquicinérgico, além de avaliar a expressão do receptor NK1, foi realizada a análise de imunodeteccão para a SP no córtex e hipocampo dos animais. A Fig. 29C mostra que o bloqueio do receptor NK1, pelo tratamento com o L-703, 606 promove uma redução dos níveis de expressão de SP na região do córtex, em comparação com os animais derrotados

(DT) que foram tratados com veículo. No hipocampo, como também descrito no item 4.2; Fig. 13C, não foi observada nenhuma alteração da expressão de SP avaliada por WB. Em conjunto, este bloco de resultados indica que, o tratamento com o antagonista do receptor NK1, o L-703, 606, parece favorecer a diminuição da ativação e/ou migração dos astrócitos, bem como a distribuição normal do receptor NK1 nestas células, nas áreas encefálicas afetadas, exercendo assim um efeito benéfico sobre as alterações observadas na ativação astrocitária e na modulação do sistema taquicinérgico induzidas pelo estresse decorrente do modelo de derrota social.

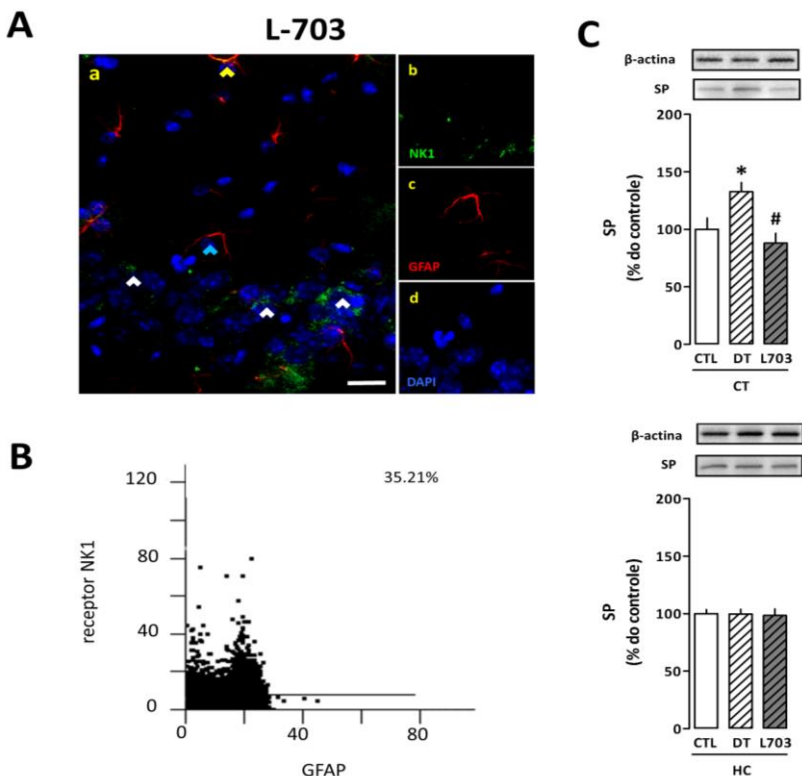


Figura 29. Efeito do tratamento com antagonista do receptor NK1 (L-703, 606) sobre a ativação astrocitária e a modulação do sistema taquicinérgico no hipocampo e córtex dos animais, induzidos pelo estresse promovido pelo modelo de derrota social. Os animais foram submetidos ao protocolo de derrota social (sessões de treino por 3h, 3 dias consecutivos) e 30 min antes da avaliação comportamental no teste de partição (24h após a última sessão de treino) foram tratados via intraperitoneal com veículo (DMSO 10%) ou o antagonista do receptor NK1 (L-703, 606) na dose de 10 mg/kg. Os cérebros foram coletados imediatamente após os animais serem submetidos ao teste de partição. (A) Imagens representativas da técnica de imunofluorescência (IF) mostrando a marcação para NK1 (verde) e GFAP (vermelho) no cérebro de um animal tratado com o L-703, 606 (a - c) na sub-região CA3 do hipocampo. O DAPI foi utilizado para marcação do núcleo (azul; e). Setas brancas: imunomarcagem para NK1 na camada de neurônios; Setas amarelas: indicativas de imunomarcagem para NK1 nos astrócitos; Setas azuis: indicativas de imunomarcagem somente para GFAP. (B) O gráfico representa a análise de colocação - equivalente a de citometria de tecido - da sub-região CA3 e GD do animal do grupo tratado com o antagonista do receptor NK1. (C) Imagens representativas das bandas obtidas por imunodeteção (WB) para a proteína SP (12 kDa) e para o controle interno β-actina (43 kDa) no hipocampo e córtex dos animais. Os gráficos representam a análise da densidade óptica da proteína SP, normalizada contra o controle β-actina, determinada em unidades arbitrárias, sendo expressos como porcentagem do grupo controle (CTL). CTL= grupo controle (todas as etapas sem o animal residente); DT= grupo derrotado; L703= grupo tratado com o antagonista do receptor NK1; CT= córtex; HC= hipocampo. Escala = 20 um. Os valores estão expressos como a média + E.P.M. (N = 3-4/grupo). * $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo CTL e # $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo DT (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni).

O estresse é um fator desencadeador para diversos transtornos psiquiátricos, porém tem um papel central no transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) que é uma das poucas doenças em que a etiologia é bem definida: a vivência ou testemunho de um evento traumático. Ainda que, ao longo dos últimos anos, as doenças intimamente relacionadas ao estresse tenham recebido crescente atenção, novas abordagens se fazem necessárias para o avanço das técnicas e modelos utilizados a fim de se encontrar novas alternativas terapêuticas mais efetivas que as atuais para o TEPT. Avanços na pesquisa pré-clínica visam uma melhor compreensão dos mecanismos neurobiológicos e das alterações moleculares relacionadas aos transtornos de estresse e certamente auxiliam na investigação de novas terapias farmacológicas.

O modelo de estresse social – como ferramenta para a pesquisa pré-clínica – caracterizado por interações de confronto incontrolável e imprevisível entre animais, é um importante modelo translacional. No presente estudo observamos que o modelo de estresse social, baseado na premissa tanto do ataque físico quanto da ameaça de ataque como fatores estressantes, promove o aumento das respostas comportamentais defensivas em diferentes tempos avaliados. Sessões de derrota social com duração de 1, 3 ou 6 h, levam a alterações comportamentais como a redução do tempo de aproximação na barreira e o aumento da frequência de execução do comportamento de avaliação de risco (*i.e.* número de estiramentos corporais). Além disso, as respostas defensivas observadas são duradouras, uma vez que, são mantidas até 30 dias após o último evento estressor. Corroborando, Hammamieh e colaboradores (2012) mostraram que de 4 a 6 semanas após a última derrota – com exposição ao agressor durante 6 h por 5 ou 10 dias consecutivos – os animais apresentam um aumento do comportamento de *freezing* (*i.e.* congelamento), diminuição da locomoção e ausência do comportamento de *tail rattling* (*i.e.* “bater de cauda”). Nosso estudo mostra evidências sólidas de que: 1) sessões mais curtas de derrota social apresentam impacto comportamental semelhante – e duradouro – aos observados em outros estudos com sessões prolongadas de estresse social em camundongos; 2) a manifestação das respostas comportamentais

defensivas nos animais derrotados ocorre mesmo na ausência do animal residente durante o teste de partição. Estas respostas ressaltam a utilidade deste modelo para o estudo do TEPT, tendo em vista a duração e generalização das respostas de defesa, assemelhando-se aos comportamentos observados em humanos acometidos pelo transtorno.

Embora, em todos os tempos avaliados, os diferentes grupos experimentais expressaram um comportamento defensivo frente ao animal agressor, os resultados mais evidentes foram observados no grupo de animais que passaram por sessões de derrota social com duração de 3 h. Sendo assim, este tempo foi eleito para proceder com os demais estudos comportamentais e moleculares deste trabalho, com o intuito de otimizar as etapas experimentais subsequentes.

Diversos estudos epidemiológicos evidenciam a alta prevalência de comorbidades psicológicas associadas ao TEPT, como depressão e ansiedade (ZATZICK *et al.*, 2012). Além de alterações psicológicas, já foi estabelecida associação às doenças cardiovasculares e metabólicas que incluem hipertensão, obesidade, dislipidemia e diabetes em pacientes com TEPT (DEDERT *et al.*, 2010; LEVINE, LEVINE, LEVINE, 2014), e em animais (KUNG *et al.*, 2010; HAMMAMIEH *et al.*, 2012; PATKI *et al.*, 2014). Quanto à investigação de comportamentos associados à comorbidades relacionadas ao TEPT nosso protocolo mostra ser capaz de modular as respostas de ansiedade nos animais, promovendo uma significativa redução da exploração dos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado, sugerindo que o estresse social promove uma resposta do tipo ansiogênica nos animais derrotados. Por outro lado, sob essas condições, nosso protocolo de estresse social, não induz comportamentos do tipo depressivo e anedônico, como um aumento da imobilidade no teste de suspensão pela cauda e a redução da preferência pela sacarose, respectivamente. Iñiguez e colaboradores (2014) observaram que camundongos C57BL/6 quando expostos a 10 dias de estresse por derrota social exibem um fenótipo do tipo ansiogênico e, distinto dos nossos resultados, um comportamento do tipo depressivo, após do último episódio de estresse. No entanto, devemos ressaltar que a duração do estresse é cerca de 3 vezes maior que a que usamos no presente trabalho (3 dias vs 10 dias).

Contudo, estudos que utilizam o modelo de derrota social com um protocolo de estresse prolongado, o fazem como uma

ferramenta de investigação de um modelo de depressão (para revisão CHAOULOFF, 2013). Portanto, quando observamos, neste estudo, a ausência de comportamentos do tipo depressivo e anedônico nos animais derrotados, interpretamos que esta foi decorrente provavelmente da menor duração das sessões de derrotas. Este é um ponto positivo do nosso modelo, visto que o utilizamos como um método para investigar as alterações de estresse e ansiedade em um modelo de TEPT, sem a influência do comportamento tipo depressivo.

Adicionalmente, quando a memória neutra dos animais submetidos ao estresse foi avaliada, através do teste de realocação de objetos, os animais derrotados mantiveram índices de reconhecimento semelhantes aos do grupo controle. Este achado contrasta com outros estudos que utilizam o modelo de derrota social crônico por períodos mais longos, como o de Yu e colaboradores (2011) que observaram déficits de memória em camundongos submetidos à derrota social por 14 dias. Por outro lado, em um estudo com ratos submetidos ao estresse social prolongado, não foi observada alteração da memória, avaliada pelo teste do *hole-board* (BUWALDA *et al.*, 2005). Este último dado reforça os nossos resultados, que evidenciam a relevância do estudo deste modelo, sem que haja nenhuma alteração na memória, tendo em vista que esta é um componente essencial para o desenvolvimento do TEPT e desempenha papel principal na generalização das respostas de defesa.

Diversos trabalhos na literatura que mostram o envolvimento de neuropeptídeos, em especial a substância P, na modulação das respostas comportamentais de estresse e ansiedade (EBNER *et al.*, 2008; MICHELSON *et al.*, 2013) nos direcionaram a investigar a contribuição deste neuropeptídeo no modelo de estresse social, ou seja, nas respostas comportamentais defensivas, anteriormente observadas. A liberação basal de substância P foi elevada nos animais derrotados em áreas cerebrais importantes no processamento do TETP como o hipocampo e córtex. A análise qualitativa das imagens da imunoistoquímica realizada revelou uma elevação mais pronunciada dos níveis de SP na camada celular de neurônios piramidais da sub-região CA3 do hipocampo. Por outro lado, a técnica de *Western blotting* mostrou uma diferença significativa na expressão de SP na região do córtex, sem alterar a expressão deste neuropeptídeo no hipocampo dos animais derrotados. Sugerimos que estas diferenças nos resultados possam

residir nas diferenças metodológicas das técnicas utilizadas, uma vez que para a realização do *Western blotting* é utilizado o homogenato do tecido hipocampal total, em contraste com a marcação específica das diferentes sub-regiões da formação hipocampal que a imunistoquímica oferece, e que por isso pode revelar alterações mais sutis. Alterações nos níveis de SP já foram demonstrados em diferentes regiões cerebrais de ratos submetidos ao modelo de derrota social (PANKSEPP *et al.*, 2007). Nossos dados confirmam o envolvimento deste neuropeptídeo nas respostas defensivas e mostram pela primeira vez o envolvimento da SP no modelo de derrota social em camundongos. No que diz respeito à modulação das respostas de estresse, nossos resultados condizem com estudos prévios da literatura que demonstram alteração do nível extracelular de SP em áreas cerebrais envolvidas na regulação das respostas de estresse e ansiedade (EBNER *et al.*, 2004; SINGEWALD *et al.*, 2008). Teixeira e colaboradores (1996) mostraram que a administração central de substância P assim como de neurocinina (agonistas dos receptores NK1 e NK2, respectivamente), promove uma redução significativa da frequência de entradas nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado, um efeito do tipo ansiogênico, em camundongos. Ainda, Aguiar & Brandão (1996) demonstraram que a SP atua no comportamento defensivo dos animais, observando que a administração direta de SP em regiões específicas do cérebro de ratos, como a substância cinzenta periaquedutal dorsal (DPAG), está associada ao aumento da resposta de medo avaliada pela redução da exploração dos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado.

Além do envolvimento da SP nas alterações das respostas comportamentais defensivas, um possível processo neuroinflamatório pode estar associado aos mecanismos neuropatológicos no modelo de estresse social, uma vez que já se encontra bem estabelecida a ação deste neuropeptídeo como mediador pró-inflamatório (WALSH *et al.*, 1995). Diferentes situações de estresse, agudo ou crônico, possuem a capacidade de modificar a função de células gliais, principalmente de micróglias, bem como demonstram um papel crítico na modulação da arquitetura neuronal (JAUREGUI-HUERTA *et al.*, 2010). Sendo assim, uma vez que nossos resultados mostraram um aumento dos níveis de SP em regiões encefálicas dos camundongos derrotados, sugerimos que um possível processo neuroinflamatório possa estar

associado ao mecanismo neuropatológico no modelo de estresse social. Para avaliar a possível participação de células gliais em resposta ao modelo avaliamos por diferentes técnicas, imunofluorescência e *Western blotting*, a imunoreatividade para células da glia como astrócitos e microglia. Observamos que ao final do protocolo de derrota social a ativação/migração de micróglia, caracterizada neste estudo pela marcação do anticorpo Iba-1, foi significativamente maior apenas no córtex dos animais derrotados, sendo ainda essa diferença encontrada apenas quando analisada pela técnica de imunofluorescência. Em contrapartida, nós verificamos um aumento expressivo da marcação para GFAP, um marcador para ativação de células astrocitárias, em ambas as técnicas utilizadas, tanto na região do hipocampo quanto no córtex dos animais derrotados.

A ativação astrocitária no protocolo de estresse social pode estar ocorrendo de modo mais proeminente na fase tardia (após o teste de partição) em razão do envolvimento da microglia estar mais associada ao processo inicial da resposta inflamatória, sendo essa ativação bem documentada nas doenças neurodegenerativas (KREUTZBERG, 1996; LIU & HONG, 2003). No entanto, em conjunto, a ativação glial (micróglia e astrócitos) tem um papel crucial na regulação e função sináptica (BACCI *et al.*, 1999; TASKER *et al.*, 2012), sendo que esta ativação exerce uma forte influência no processo de neurodegeneração (LIU & HONG, 2003). Fisiologicamente os astrócitos estão envolvidos em processos relacionados à estrutura e circulação celular e tem sido proposto que eles possam atuar no desenvolvimento e manutenção das sinapses (FAISSNER *et al.*, 2010) e ainda, na comunicação celular entre astrócitos e neurônios (NEDERGAARD *et al.*, 2003). No entanto, uma resposta exacerbada astrocitária pode exercer efeitos deletérios devido, entre outros fatores, à liberação de mediadores inflamatórios (LITTLE & O'CALLAGHA, 2001; ZHANG *et al.*, 2010).

Estes dados nos incitaram a avaliar um possível processo neurodegenerativo decorrente do estresse social, mais especificamente através da avaliação da morte neuronal. Interessantemente, o curto tempo de estresse social – 3 h durante 3 dias consecutivos – ao qual os animais foram submetidos, foi capaz de promover a morte neuronal, sendo este dano neuronal dependente da região. A morte neuronal foi evidente na camada de células piramidais da sub-região CA3 e na camada de células granulares do giro dentado, mas não da sub-região CA1 do

hipocampo. Além das regiões do hipocampo, o córtex dos animais derrotados também se mostrou afetado pelo estresse social. Nosso protocolo de estresse promoveu em um período relativamente curto, a morte neuronal sendo esse um processo comumente observado em protocolos de estresse prolongado (CZECH *et al.*, 2005). Apoiados neste conjunto de resultados, sugerimos que o processo neuroinflamatório é desencadeado pelo aumento excessivo de liberação de SP nas regiões CA3 do hipocampo e no córtex e que precede a morte neuronal observada nessas regiões. Ainda, permanece em aberto o provável mecanismo envolvido no processo degenerativo observado, sendo necessárias mais investigações.

A literatura evidencia que as células astrocitárias expressam uma grande quantidade de receptores acoplados à proteína G (TASKER *et al.*, 2012). Visto que observamos uma íntima ligação da substância P com a ativação de células que participam do processo neuroinflamatório no modelo de derrota social, buscamos avaliar a expressão de receptores taquicinérgicos, especificamente o receptor de interesse, o NK1, em cultura de células gliais. Corroborando achados da literatura (LAZARCZYK *et al.*, 2007), observamos que o receptor NK1 está expresso tanto na microglia quanto nas células astrocitárias. É importante ressaltar ainda que quando mimetizamos uma situação de estresse sofrida pelos animais, submetendo as culturas de células astrocitárias ao tratamento com 1 μ M de SP (estresse químico) observamos um aumento da imunomarcagem positiva para os receptores NK1. Esses achados também foram observados nas análises realizadas a partir de tecido dos animais derrotados. A substância P, um reconhecido mediador do processo inflamatório (WALSH *et al.*, 1995), parece desempenhar um papel essencial no astrócito, uma vez que já foi demonstrado o efeito estimulador da SP na produção de citocinas pelas células astrocitárias, via receptor NK1 (DEROCQ *et al.*, 1996). A liberação excessiva de citocinas pode levar ao processo de neurodegeneração (ALLAN & ROTHWELL, 2001). Portanto, podemos sugerir que a liberação de citocinas pelos astrócitos, possa estar contribuindo para o processo neurodegenerativo anteriormente observado.

Em um primeiro momento, considerando os seguintes resultados: 1) o aumento de NK1 e 2) a ativação astrocitária nos encéfalos dos animais derrotados, 3) a expressão de NK1 em células astrogliais e 4) a colocalização deste receptor com os astrócitos em cultura, pareceu-nos evidente que o aumento da

expressão do receptor NK1 ocorre devido a uma maior ativação astrocitária. No entanto, foi notável, ao analisar as imagens de IF das fatias dos animais submetidos ao estresse social, que acontece não somente uma maior colocação do receptor NK1 nas células astrocitárias, mas também uma redução paralela da expressão destes receptores na camada de neurônios. Este dado pode ser explicado pelo aumento da disponibilidade de SP extracelular, induzido pelo estresse, que leva a internalização do seu receptor, o NK1. Neste sentido, um possível mecanismo de regulação negativa (*downregulation*) pode ser induzido por agonistas de receptores à proteína G ou por substâncias que aumentam a disponibilidade extracelular dos neurotransmissores que ativam estes receptores (VON ZASTROW, 2001). Em conjunto, estes resultados sugerem uma redistribuição neuronal e astrocitária dos receptores NK1 após o aumento excessivo de SP e fortalecem o papel da ativação do sistema taquicínérgico nas células astrocitárias que parecem atuar na manutenção do processo neuropatológico observado no modelo de estresse social.

Como mencionado anteriormente, de modo contrário ao observado com a substância P e agonistas do receptor NK1 que atuam promovendo respostas de ansiedade e estresse, o bloqueio destes receptores se mostra eficaz em produzir efeitos do tipo ansiolítico após a administração tanto intracerebroventricular quanto sistêmica (TEIXEIRA *et al.*, 1996; VARTY *et al.*, 2002). Fortalecendo esses achados, estudos genéticos confirmam que o fenótipo de ansiedade em camundongos é afetado pelo sistema taquicínérgico. Camundongos deficientes em substância P apresentam fenótipo comportamental semelhante a animais nocautes para o receptor NK1, demonstrando menor nível de ansiedade e evidenciando o importante papel deste sistema na modulação do comportamento emocional (para revisão ver BILKEI-GORZO & ZIMMER, 2005).

Em conjunto com os resultados obtidos neste trabalho e o embasamento da literatura destacando o envolvimento do sistema taquicínérgico na resposta ao estresse, buscamos investigar a modulação das respostas comportamentais defensivas, decorrentes do estresse social, após a administração de um antagonista seletivo e não peptídico do receptor NK1, o L-703, 606. O bloqueio sistêmico dos receptores NK1, na maior dose usada (10 mg/kg), foi capaz de reduzir o comportamento defensivo dos animais derrotados. O parâmetro comportamental de tempo de aproximação na barreira apresentou um aumento significativo nos animais tratados com este

antagonista, sendo semelhante ao tempo desprendido na barreira pelos animais do grupo controle, isto é, que não foram submetidos a sessões de derrota social. Desta forma, nossos resultados evidenciam a participação e a importância do sistema taquicínérgico nas respostas defensivas no modelo de derrota social.

Além disso, análises adicionais mostraram que o efeito do bloqueio dos receptores NK1 observado é livre de interferência locomotora, uma vez que, não houve nenhuma alteração na distância total percorrida e na velocidade média dos grupos experimentais submetidos ao tratamento. Ainda, nenhuma mudança nestes mesmos parâmetros foi observada entre os animais do grupo controle e do grupo derrotado (dados não apresentados). Ademais, o antagonista *per se*, não apresentou prejuízo mnemônico no teste do reconhecimento de objeto, descartando, uma possível ação amnésica na dose testada. Desta maneira, esses dados ressaltam o efeito benéfico do bloqueio da ação da SP sobre o enfrentamento da situação de estresse em camundongos.

Ainda, na continuidade deste trabalho foram avaliadas as alterações decorrentes do estresse social sobre outros parâmetros moleculares, como alterações relacionadas ao eixo HPA, assim como a modulação das alterações observadas anteriormente pelo bloqueio dos receptores NK1 após o modelo de derrota social. Os glicocorticóides desempenham um papel importante tanto no início como no término da resposta ao estresse. Estudos sugerem um papel dual, no qual em um primeiro momento o aumento da liberação de glicocorticóides é essencial para preparar o organismo para a reação de defesa, além disso, atuam de modo a impedir o consequente aumento de glicocorticóides que ocorre em resposta a situação de estresse a longo prazo, ou seja, no controle da homeostase (SAPOLSKY, ROMERO, MUNCK, 2000; KRUK *et al.*, 2005; JOËLS, 2006). Porém, uma desregulação no sistema acaba por produzir um aumento excessivo predispondo a uma maior vulnerabilidade (DERIJK & DE KLOET, 2008).

A elevação dos níveis de corticosterona em animais após situações de estresse distintas tem sido comumente observada em diversos estudos da literatura (HILL *et al.*, 2009). Contudo, nossos resultados indicaram uma ausência de alteração nos níveis de corticosterona avaliado nos animais submetidos ao estresse social. Embora estudos tenham mostrado aumento no nível de corticosterona decorrente do estresse (MARTIN, CRUZ, PLANETA, 2007; RABASA *et al.*, 2011; BROWNE *et al.*, 2014), estudos clínicos

mostram que pacientes com TEPT não apresentam este aumento (YEHUDA *et al.*, 2007). Nossos dados nos níveis de corticosterona podem ser explicados pelo decurso temporal das alterações ao longo do protocolo, visto que as coletas foram realizadas após o teste de partição, ou seja, mimetizando o momento clínico após o desenvolvimento do transtorno. Avaliações pontuais em todas as etapas do protocolo, mais precisamente após cada sessão de treino, poderiam revelar alterações significativas nos níveis de corticosterona que contribuiriam para o fortalecimento do modelo e confirmaríamos dados da literatura já citados. Desta maneira, supomos que o aumento dos níveis de corticosterona possa estar ocorrendo em um estágio mais inicial, como por exemplo, minutos após a situação de confronto entre os animais (uma vez que coleta do material ocorreu 24h após a última sessão de derrota). Uma provável adaptação e/ou reestabelecimento dos níveis de corticosterona pode ser observada ao final dos 4 dias do protocolo de derrota social utilizado no nosso estudo. Embora situações de estresse estejam geralmente associada a um aumento nos níveis de glicocorticóide, os dados apresentados e nossas suposições sobre a alteração temporal nos níveis de corticosterona, encontram respaldo na literatura que mostra um pico da corticosterona plasmática entre 15 e 30 min após o conflito social (KEENEY *et al.*, 2006), com duração de cerca de 4h (DE GROOT *et al.*, 1999). Ainda, é válido ressaltar que o direcionamento da atividade do eixo HPA, ou seja, hiper ou hipoativação é dependente de diferentes variáveis tais como a vulnerabilidade genética, alterações epigenéticas, idade, tipo e duração do estresse e ainda, associação com outras psicopatologias (PERVANIDOU & CHROUSOS, 2010).

O bloqueio do receptor NK1, pelo L-703, 606 promoveu uma redução de aproximadamente 50%, em relação tanto ao grupo derrotado, quanto ao grupo controle. Nesse sentido, nossos dados reforçam a participação do receptor NK1 na modulação do eixo HPA, visto que uma ampla distribuição destes receptores está presente no PVN (núcleo paraventricular do hipotálamo), além de outras estruturas envolvidas nesta regulação, sugerindo uma provável regulação direta do eixo (CARRASCO & VAN DE KAR, 2003). Além disso, a modulação no nível de corticosterona pode envolver alterações, tanto funcionais quanto morfológicas, nas diferentes estruturas do eixo HPA e em estruturas associadas à regulação da atividade do eixo, como por exemplo, o hipocampo (BEITIA *et al.*, 2005; VAN-DIJKEN *et al.*, 1993). Estudos apontam

que alterações nos neurônios piramidais da sub-região CA3 do hipocampo podem estar relacionadas com as alterações na inibição da retroalimentação negativa do eixo HPA, levando em conta a posição estratégica dos neurônios desta região e as suas prováveis ligações inibitórias transsináptica com neurônios paraventriculares (KOLE *et al.*, 2004). Em conjunto com os dados apresentados de morte neuronal que mostram uma acentuada degeneração na região CA3 do hipocampo.

Nossa hipótese de um aumento da liberação de glicocorticoides em um momento inicial do protocolo é suportada pela literatura que mostra que ocorre a modulação de GR, considerada uma resposta tardia a uma desregulação do eixo HPA (DERIJK & DE KLOET, 2008). Em situações de estresse são comumente observadas alterações na função e expressão de receptores de glicocorticoides (GR) sendo essas mudanças associadas a distúrbios psiquiátricos como a depressão e o transtorno de estresse pós-traumático (YEHUDA *et al.*, 1991). Nossos resultados mostram que o estresse social parece modular a expressão de GR no hipocampo e córtex. Uma expressão diminuída de GR foi observada na sub-região CA3 do hipocampo e também no córtex decorrente da situação de estresse social. O tratamento com o antagonista do receptor NK1 parece reestabelecer a expressão deste receptor nestas estruturas, uma vez que a imunomarcagem positiva para GR é semelhante ao observado no grupo controle após este tratamento. Esses dados são condizentes com as análises de *Western blotting* do córtex e hipocampo após a situação de estresse, embora não tenha sido possível observar o efeito benéfico do tratamento com o antagonista NK1 no hipocampo pela mesma técnica. Sugerimos que os resultados divergentes encontrados possam residir nas diferenças das técnicas empregadas, principalmente no que diz respeito ao tamanho da amostra analisada, uma ínfima fatia da estrutura comparada a totalidade da estrutura em questão, por imunofluorescência e *Western blotting*, respectivamente. De forma similar, estudos com roedores mostram que uma única exposição a um estímulo estressor, por exemplo, choque ou imobilização, pode resultar em dessensibilização de GR e alterações dos níveis plasmáticos de corticosterona (ARMARIO, 2006). Nesse sentido, outros estudos mostram que ratos submetidos a diferentes condições de estresse durante 7 dias exibem uma diminuição no nível de GR nas diferentes sub-regiões do hipocampo. Porém, no mesmo estudo, 1 semana após a exposição ao estresse,

os animais apresentam níveis elevados de GR comparado ao controle (LIBERZON *et al.*, 1999). Mizoguchi e colaboradores (2003) observaram, ainda, uma redução dos níveis de GR no córtex pré-frontal e um aumento no hipocampo após estresse crônico em ratos, induzido por imersão na água e imobilização durante 4 semanas. Esses dados ressaltam que há diferenças na regulação da retroalimentação negativa do eixo HPA, e que residem em particular no tipo de estressor e duração do estresse (JOËLS, 2011), sendo a regulação do eixo HPA um mecanismo altamente complexo e dinâmico (DE KLOET, JOËLS, HOLLSBOER, 2005).

Em condições de estresse repetido incontrolável e imprevisível, podem ocorrer alterações morfológicas em regiões específicas do cérebro e, eventualmente, suprimir a neurogênese adulta (MIRESCU & GOULD, 2006; JOËLS *et al.*, 2006). Embora, em condições apropriadas, os glicocorticoides desempenham um papel importante na maturação e diferenciação neuronal (JOËLS, 2011), estudos têm demonstrado, de maneira consistente, a influência da ação do estresse, como da ativação de GR, em tecidos alvo como o hipocampo, promovendo dano neuronal na proliferação, diferenciação e morte neuronal, resultando na alteração estrutural e funcional desta região (WOOLLEY, GOULD, MCEWEN, 1990; YU *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2004; FUJIOKA *et al.*, 2006).

Um estudo recente demonstrou os efeitos induzidos por diferentes concentrações de cortisol em um modelo de cultura de células fetais humana, em que uma baixa concentração de cortisol ativa, predominantemente, os MR promovem um aumento da proliferação neuronal e no desenvolvimento de astrócitos, enquanto que uma alta concentração leva à ativação principalmente de GR e reduz tanto a proliferação neuronal quanto a indução de astrogliogênese pelos receptores MR (ANACKER *et al.*, 2013). Outros estudos ressaltam o envolvimento dos GRs neste processo, uma vez que, um efeito benéfico da neurogênese pode ser observado pelo antagonismo dos mesmos (ANACKER *et al.*, 2011; MAYER *et al.*, 2006).

Como um provável mecanismo de ação, já tem sido demonstrado que a ativação de GR promove a ativação de vias de sinalização como MAP quinase (proteína quinase ativada por mitógeno), adenilato ciclase ou proteína quinase C (PKC) e também aumento dos níveis de Ca^{+2} intracelular (COTE-VÉLEZ *et al.*, 2008; CORSINI *et al.*, 2014). Ainda, em conjunto com a evidente participação do processo inflamatório pela ativação de células da

glia, especulamos o possível envolvimento de citocinas inflamatórias liberadas pelo evento estressor, tendo em vista que estressores psicológicos, como o condicionamento aversivo em animais, desencadeia a liberação desses mediadores antes mesmo da elevação dos níveis de glicocorticóides. A ativação do sistema imune precocemente parece favorecer a liberação subsequente de glicocorticóides, seja através da liberação de citocinas que estimulam o eixo HPA, como por exemplo, IL-1, IL-6 e TNF- α ou pela síntese de moléculas com ação semelhante ao ACTH (SAPOLSKY, ROMERO, MUNCK, 2000).

A formação hipocampal tem sido amplamente estudada no que diz respeito às alterações morfológicas e funcionais associadas à neuropatologia de distúrbios psiquiátricos como o TEPT (MCEWEN, 1999; HOSCHL & HAJEK, 2001). Estudos em modelos animais mostram que a exposição a uma situação estressante resulta em alterações estruturais que incluem a inibição da neurogênese no giro denteado adulto, remodelação dos dendritos das células piramidais da sub-região CA3 e redução do volume hipocampal (GOULD *et al.*, 1997; CZECH *et al.*, 2002; VAN DER HART *et al.*, 2002). Embora, presumidamente, o processo de neurogênese ocorra especialmente na região subventricular do giro denteado e no bulbo olfatório, achados posteriores sugerem que a neurogênese possa ser observada também em outras regiões do SNC como neocórtex e amígdala (OKUDA *et al.*, 2009). No entanto, é especulado que os neurônios recém-formados sejam originados na região subventricular do giro denteado e migrem até estes locais (GOULD *et al.*, 1999). Além disso, a neurogênese no hipocampo tem sido sugerida como um dos substratos neurais envolvidos na neuropatofisiologia dos distúrbios relacionados ao estresse devido à resposta inadequada frente ao evento estressor (RUAN *et al.*, 2014). Apoiando o papel da neurogênese nestes distúrbios, é observado em pacientes diagnosticados com TEPT a interrupção da sinalização de BDNF (KAPLAN, VASTERLING, VEDAK, 2010), sendo este fator neurotrófico necessário para o aumento da neurogênese hipocampal, excitabilidade, sobrevivência celular e neuroplasticidade no cérebro adulto (para revisão SURI & VAIDYA, 2013).

Nossos dados mostram que a redução da expressão de BDNF após o estresse psicossocial é inibida pelo antagonismo do receptor NK1, sendo esse processo reestabelecido de forma similar aos animais não estressados quando avaliado no córtex. Por outro lado, é importante ressaltar que embora através da técnica de WB

não tenha sido observada uma redução da neurogênese no hipocampo, o tratamento com o antagonista do receptor NK1 aumenta substancialmente a expressão de BDNF nesta estrutura. Nesse sentido, as alterações na expressão de BDNF associado a protocolos de estresse têm sido avaliados por diversos trabalhos como o estudo de Pizarro e colaboradores (2004) que mostraram por hibridização *in situ* que o estresse social agudo promove redução da expressão de BDNF em áreas corticais e subcorticais, como hipocampo e amígdala. Em contrapartida, outros estudos têm demonstrado que o processo de diferenciação na neurogênese hipocampal não é afetado, avaliado dentre outros marcadores pela expressão de BDNF (KIM *et al.*, 2004). Estas divergências podem ser explicadas com base no uso de diferentes paradigmas de indução de estresse em animais, uma vez que, resultados contrastantes podem ser obtidos pelo uso de protocolos distintos, no que diz respeito à intensidade e duração do estresse, e isso pode afetar, diferentemente, o processo de neurogênese. O tratamento crônico ou subcrônico com antagonistas dos receptores NK1, e com drogas que induzem efeito ansiolítico e antidepressivo se mostram eficazes em prevenir a redução da neurogênese em modelos animais (GOULD *et al.*, 1997; VAN DER HART *et al.*, 2002; SANTARELLI *et al.*, 2003; CZECH *et al.*, 2005; JIANG *et al.*, 2005). Portanto, observamos efeito similar após a administração agudo do L-703, 606, reforçando a importância da modulação do sistema taquicinérgico neste protocolo.

A redução da expressão de espinofilina pode ser sugestiva de uma redução transitória na densidade de espinhas dendríticas provável de uma remodelação resultante do hipocampo (LEUNER & GOULD, 2010). De maneira semelhante ao encontrado para o marcador BDNF e para DCX, observamos também uma redução expressiva da marcação para espinofilina nos animais derrotados, reforçando a ideia de que a neurogênese é afetada pelo processo patológico do estresse social. Estudos têm demonstrado que o estresse crônico mimetizado pela administração diária de corticosterona, ou ainda, o estresse repetido induzem a perda de espinhas dendríticas enquanto que a administração diária de um antagonista de GR é capaz de inibir essa perda (RANDLEY *et al.*, 2006; LIU & AGHAJANIAN, 2008; MITRA & SAPOLSKY, 2008; GOURLEY, SWANSON, KOLESKE, 2013). De modo contrastante, outros estudos sugerem que o estresse agudo pode aumentar a densidade e morfologia das espinhas dendríticas através de uma

potencialização da resposta excitatória facilitada por receptores NMDA e AMPA, por um mecanismo dependente do aumento da corticosterona em resposta ao estresse agudo (KOMATSUZAKI *et al.*, 2005). O mais importante deste bloco de dados é o papel do sistema taquicinérgico nestes eventos. A ativação do sistema taquicinérgico parece ser prejudicial contribuindo para os efeitos deletérios observados no protocolo deste estudo, uma vez que, a administração do antagonista dos receptores NK1 é benéfica em todos os marcadores de neurogênese avaliados.

Por fim, considerando todos os efeitos benéficos do antagonista do NK1 acima citados, retomamos os achados iniciais deste trabalho que mostram o aumento na ativação e/ou migração astrocitária no modelo de derrota social e buscamos elucidar se a modulação do sistema taquicinérgico poderia contribuir de maneira benéfica sobre estas alterações. Interessantemente, foi observado que o bloqueio do receptor NK1, pela administração do L-703, 606, reduz a imunomarcagem positiva para GFAP no hipocampo dos animais. Aliado as análises de citometria de tecido, é importante ressaltar, que o bloqueio do receptor NK1 conduziu ao reestabelecimento da distribuição deste receptor na camada neuronal no hipocampo, reduzindo ainda, a colocalização do mesmo receptor na população astrocitária, de modo semelhante às condições basais. Em um contexto patológico similar, porém abordando a doença de Parkinson (DP), Thornton & Vink (2012) observaram que a exacerbação dos níveis de SP induziu a progressão da DP, através da inflamação que contribuiu para a degeneração dopaminérgica. No entanto, o bloqueio do receptor de NK1 contribuiu para a integridade dos neurônios dopaminérgicos, redução da neuroinflamação e melhora da função locomotora dos animais. Considerando estes resultados e como mencionado anteriormente, devido à capacidade da SP induzir a secreção de citocinas pró-inflamatória a partir de células astrogliais (DEROCQ *et al.*, 1996), sugerimos que o bloqueio dos receptores NK1 nos astrócitos reativos promova um efeito benéfico e contribui para a prevenção dos danos neurofisiopatológicos decorrente do estresse social.

Em conjunto, os dados obtidos neste trabalho nos permitiram sugerir o possível papel da substância P e do receptor NK1 nos processos neurobiológicos desencadeados pelo estresse decorrente da derrota social e são apresentados esquematicamente na Figura 32.

6. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

- As respostas comportamentais defensivas foram observadas em todos os diferentes tempos de sessão treino (1, 3 e 6 h) e, ainda, após um longo período após o estresse social, evidenciando que sessões mais curtas de estresse (3 h), induzido pelo modelo de derrota social, promoveu respostas comportamentais defensivas duradouras (30 dias após o último evento estressor);
- O estresse social induzido por sessões de treino de curta duração (3h/3 dias) promove alteração comportamental do tipo ansiogênica nos animais intrusos, sem alterar comportamentos preditivos de comportamentos do tipo depressivo e anedônico. Além disso, a memória neutra dos animais não é afetada pelo protocolo experimental adotado neste estudo;
- O estresse social promovido pelo modelo de derrota social requer o envolvimento do sistema taquicinérgico - neuropeptídeo SP e seu principal receptor NK1 - na promoção das respostas comportamentais defensivas;
- O aumento excessivo de SP em razão do estresse social culmina com a ativação astrocitária em estruturas importantes, como o hipocampo e córtex, envolvidas na neurobiologia do transtorno de estresse pós-traumático;
- O aumento da expressão do receptor NK1 em células astrocitárias e concomitantemente uma redução da expressão deste receptor na camada de neurônios, foi observado após o estresse social induzido pelo modelo de derrota social;
- O aumento excessivo de SP associado ao processo de neuroinflamação após o estresse social induzido pelo modelo de derrota social promove degeneração neuronal no hipocampo e córtex dos animais intrusos;

- O antagonista seletivo e não-peptídico do receptor NK1, L-703-606, promoveu a redução das respostas comportamentais defensivas nos animais derrotados, avaliado no teste de partição na presença do animal residente;
- O antagonista seletivo dos receptores NK1, L-703, 606, modula de maneira benéfica marcadores de estresse, evidenciado pela redução do nível de corticosterona e pelo aumento da expressão de receptores para glicocorticoides, que são reduzidos pelo estresse social.
- O bloqueio dos receptores NK1 promoveu um aumento da expressão de BDNF, entre outros marcadores de neurogênese avaliados, como espinofilina e doublocortina, que se encontram reduzidas após o estresse social;
- O bloqueio dos receptores NK1 promoveu a redução da expressão de SP no córtex dos animais derrotados, bem como a redução da ativação astrocitária e da colocalização GFAP/NK1, um possível mecanismo de reestabelecimento do sistema taquicinérgico em relação ao desbalanço anteriormente observado;

7. CONCLUSÃO

Conjuntamente, os dados do presente trabalho sugerem o envolvimento da substância P nas respostas comportamentais e neurobiológicas ao estresse de derrota social, sendo este mecanismo inicial determinante para a instalação de um processo neuroinflamatório que parece ser dependente da ativação microglial e principalmente astrocitária. Além disso, o bloqueio dos receptores NK1 promove efeitos benéficos importantes nas respostas ao estresse evidenciando-o como um possível alvo terapêutico para o tratamento de doenças relacionadas ao estresse, como o transtorno de estresse pós-traumático.

8. REFERÊNCIAS

- <<http://www.ptsd.va.gov/public/treatment/therapy-med/treatment-ptsd.asp>> National Center for PTSD. Acesso em 18 de janeiro de 2015.
- ADAMEC, R.; WALLING, S.; BURTON, P. Long-lasting, selective, anxiogenic effects of feline predator stress in mice. *Physiology & Behavior*, v.83, p.401–410, 2004.
- AGUIAR, M. S.; BRANDÃO, M. L. Effects of microinjections of the neuropeptide substance P in the dorsal periaqueductal gray on the behaviour of rats in the plus-maze test. *Physiology & Behavioral*, v.60(4):1183-6, 1996.
- ALLAN, S. M.; ROTHWELL, N. J. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, v.2(10), p.734-44, 2001.
- ALLDREDGE, B. Pathogenic involvement of neuropeptides in anxiety and depression. *Neuropeptides*, v.44, p.215–224, 2010.
- ALLEN, P. B.; OUIMET, C. C.; GREENGARD, P. Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, v.94(18), p.9956-61, 1997.
- ALMADA, R. C.; ALBRECHET-SOUZA, L.; BRANDÃO, M. L. Further evidence for involvement of the dorsal hippocampus serotonergic and γ -aminobutyric acid (GABA)ergic pathways in the expression of contextual fear conditioning in rats. *The Journal of Psychopharmacology*, v.27(12), p.1160-8, 2013.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, (DSM-III)* 3. Washington, DC: American Psychiatric Association; 1980.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, (DSM-V)5. Washington, DC: American Psychiatric Association; 2013.

ANACKER, C.; ZUNSZAIN, P. A.; CATTANEO, A.; CARVALHO, L. A.; GARABEDIAN, M. J.; THURET, S.; PRICE, J.; PARIANTE, C. M.. Antidepressants increase human hippocampal neurogenesis by activating the glucocorticoid receptor. *Molecular Psychiatry*, v.16, p.738–750, 2011.

ARMARIO, A. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, v.5, p.485-501, 2006.

ARMARIO, A.; MARTI, O.; MOLINA, T.; DE PABLO, J.; VALDES M. Acute stress markers in humans: response of plasma glucose, cortisol and prolactin to two examinations differing in the anxiety they provoke. *Psychoneuroendocrinology*, v.21(1), p.17-24, 1996.

ASSINI, F. L.; DUZZIONI, M.; TAKAHASHI, R. N. Object location memory in mice: pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. *Behavioural Brain Research*, v.204(1), p.206-11, 2009.

BACCI, A.; VERDERIO, C.; PRAVETTONI E, MATTEOLI M. The role of glial cells in synaptic function. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, v.354(1381), p.403-9, 1999..

BARLOW, D. H.; DURAND, V. M. *Psicopatologia: uma abordagem integrada*. 4ª ed, São Paulo. Cengage Learning, 2008

BAUMAN, N. M.; WANG, D.; LUSCHEI, E. S.; TALMAN, W. T. Effect of substance P injection into the nucleus *tractus solitarius* of rats on cricothyroid and thyroarytenoid motor activity and cardiovascular and respiratory systems. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*, v.111(10), p.875-83, 2002.

BEITIA, G.; GARMENDIA, L.; AZPIROZ, A.; VEGAS, O.; BRAIN, P. F.; ARREGI, A. Time-dependent behavioral, neurochemical,

and immune consequences of repeated experiences of social defeat stress in male mice and the ameliorative effects of fluoxetine. *Brain, Behavior and Immunity*, v.19(6), p.530-9, 2005.

BENOLIEL, R.; ELIAV, E.; MANNES, A. J.; CAUDLE, R. M.; LEEMAN, S.; IADAROLA, M. J. Actions of intrathecal diphtheria toxin-substance P fusion protein on models of persistent pain. *Pain*, v.79, p.243-253, 1999.

BERARDI, A.; TREZZA, V.; PALMERY, M.; TRABACE, L.; CUOMO, V.; CAMPOLONGO, P. An updated animal model capturing both the cognitive and emotional features of post-traumatic stress disorder (PTSD). *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v.8, p.142, 2014.

BERTON, O.; DURAND, M.; AGUERRE, S.; MORMÈDE, P.; CHAOULOFF, F. Behavioral, neuroendocrine and serotonergic consequences of single social defeat and repeated fluoxetine pretreatment in the Lewis rat strain. *Neuroscience*, v. 92(1), p. 327-341, 1999.

BERTON, O.; MCCLUNG, C. A.; DILEONE, R. J.; KRISHNAN, N. V.; RENTHAL, W.; RUSSO, S. J.; GRAHAM, D.; TSANKOVA, N. M.; BOLANOS, C. A.; RIOS, M.; MONTEGGIA, L. M.; SELF, D. W.; NESTLER, E. J. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science*, v.311, p.864-868, 2006.

BICCA, M. A., Papel do receptor B2 para as cininas na neuroinflamação induzida pelo peptídeo beta-amilóide. 2012. 126 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BILKEI-GORZO, A.; ZIMMER, A. Mutagenesis and knockout models: NK1 and substance P. *Handbook of Experimental Pharmacology*, v.169, p.143-62., 2005.

BJÖRKQVIST, K. Social defeat as a stressor in humans. *Physiology & Behavior*, v.73, p.435–42, 2001.

- BLANCHARD, D. C.; SPENCER, R. L.; WEISS, S. M.; BLANCHARD, R. J.; MCEWEN, B.; SAKAI, R. R. Visible burrow system as a model of chronic social stress: behavioral and neuroendocrine correlates. *Psychoneuroendocrinology*, v.20, p.117-134, 1995.
- BLANCHARD, R. J.; MCKITTRICK, C. R.; BLANCHARD, D. C. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiology & Behavior*, v.73(3), p.261-71, 2001.
- BRENNER, K.; ST-HILAIRE, A.; LIU, A.; LAPLANTE, D. P.; KING, S. Cortisol response and coping style predict quality of life in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, v.128(1-3), p.23-9, 2011.
- BRESLAU, N.; KESSLER, R. C.; CHILCOAT, H. D.; SCHULTZ, L. R.; DAVIS, G. C.; ANDRESKI, P. Trauma and posttraumatic stress disorder in the community: the 1996 Detroit Area Survey of Trauma. *Archives of General Psychiatry*, v.55, p.626-32, 1998.
- BROIZ, A. C.; BASSI, G. S.; DE SOUZA SILVA, M. A.; BRANDÃO, M. L. Effects of neurokinin-1 and 3-receptor antagonists on the defensive behavior induced by electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray. *Neuroscience*, v.201, p.134-45, 2012.
- BROWN, G. W.; HARRIS, T. O. Life events and measurement. In: Brown, GW.; Harris, TO., editors. *Life Events and Illness*. London (NY): The Guilford Press, p. 3-45, 1989.
- BROWN, V. M.; MOREY, R. A. Neural systems for cognitive and emotional processing in posttraumatic stress disorder. *Frontiers in Psychology*, v.3, p.:449, 2012.
- BROWNE, C. A.; HANKE, J.; ROSE, C.; WALSH, I.; FOLEY, T.; CLARKE, G.; SCHWEGLER, H.; CRYAN, J. F.; YILMAZER-HANKE, D. Effect of acute swim stress on plasma corticosterone and brain monoamine levels in bidirectionally

selected DxH recombinant inbred mouse strains differing in fear recall and extinction. *Stress*, v.17(6), p.471-83, 2014.

BRUEL-JUNGERMAN, E.; RAMPON, C.; LAROCHE, S. Adult hippocampal neurogenesis, synaptic plasticity and memory: facts and hypotheses. *Reviews in the Neurosciences*, v.18(2), p.93-114, 2007.

BUWALDA, B.; KOLE, M. H.; VEENEMA, A. H.; HUININGA, M.; DE BOER, S. F.; KORTE, S. M.; KOOLHAAS, J. M. Long-term effects of social stress on brain and behavior: a focus on hippocampal functioning. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, v.29(1), p.83-97, 2005.

CALABRESE, F.; MOLTENI, R.; RACAGNI, G.; RIVA, M. A. Neuronal plasticity: a link between stress and mood disorders. *Psychoneuroendocrinology*, S208-16, 2009.

CARRASCO, G. A.; VAN DE KAR, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. *European Journal Pharmacology*, v.463, p.235–272, 2003.

CATENA-DELL'OSSO, M.; FAGIOLINI, A.; MARAZZITI, D.; BARONI, S.; BELLANTUONO, C. Non-monoaminergic targets for the development of antidepressants: focus on neuropeptides. *Mini Reviews in Medicine Chemistry*, v.13, p. 2-10, 2013.

CHANG, M. M.; LEEMAN, S. E.; NIAL, H. D. Amino-acid sequence of substance P. *Nature New Biology*, v.232, p.86-7, 1971.

CHAOULOFF, F. Social stress models in depression research: what do they tell us? *Cell and Tissue Research*, v.354(1), p.179-90, 2013.

COHEN, H.; KOZLOVSKY, N.; ALONA, C.; MATAR, M. A.; JOSEPH, Z. Animal model for PTSD: from clinical concept to translational research. *Neuropharmacology*, v.62(2), p.715-24, 2012.

- CORSINI, E.; PINTO, A.; GALBIATI, V.; VIVIANI, B.; GALLI, C. L.; MARINOVICH, M.; RACCHI, M. Corticosteroids modulate the expression of the PKC-anchoring protein RACK-1 and cytokine release in THP-1 cells. *Pharmacological Research*, v.81, p.10-6, 2014.
- COTE-VÉLEZ, A.; PÉREZ-MARTÍNEZ, L.; CHARLI, J. L.; JOSEPH-BRAVO, P. The PKC and ERK/MAPK pathways regulate glucocorticoid action on TRH transcription. *Neurochemical Research*, v.33(8), p.1582-91, 2008.
- CZECH, B.; WELT, T.; FISCHER, A. K.; ERHARDT, A.; SCHMITT, W.; MULLER, M. B.; TOSCHI, N.; FUCHS, E.; KECK, M. E. Chronic psychosocial stress and concomitant repetitive transcranial magnetic stimulation: effects on stress hormone levels and adult hippocampal neurogenesis. *Biological Psychiatry*, v.52, p.1057–1065, 2002.
- CZECH, B.; SIMON, M.; VAN DER HART, M. G.; SCHMELTING, B.; HESSELINK, M. B.; FUCHS, E. Chronic stress decreases the number of parvalbumin-immunoreactive interneurons in the hippocampus: prevention by treatment with a substance P receptor (NK1) antagonist. *Neuropsychopharmacology*, v.30(1), p.67-79, 2005.
- DAUGÉ, V.; LÉNA, I. CCK in anxiety and cognitive processes. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v.22(6), p.815-25, 1998.
- DE GROOT, J. VAN MILLIGEN, F. J.; MOONEN-LEUSEN, B. W.; THOMAS, G.; KOOLHAAS, J. M. A single social defeat transiently suppresses the anti-viral immune response in mice. *Journal of Neuroimmunology*, v.95(1-2), p.143-51, 1999.
- DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Review Neuroscience*, v.6(6), p.463-75, 2005.

- DEDERT, E. A.; CALHOUN, P. S.; WATKINS, L. L.; SHERWOOD, A.; BECKHAM, J. C. Posttraumatic stress disorder, cardiovascular, and metabolic disease: a review of the evidence. *Annals of Behavioral Medicine* , v.39(1), p.61-78, 2010.
- DERIJK, R. H.; De KLOET, E. R. Corticosteroid receptor polymorphisms: determinants of vulnerability and resilience. *European Journal Pharmacology*, v.583(2-3), p.303-11, 2008.
- DEROCQ, J. M.; SÉGUI, M.; BLAZY, C.; EMONDS-ALT, X.; LE FUR, G.; BRELIRE, J. C.; CASELLAS, P. Effect of substance P on cytokine production by human astrocytic cells and blood mononuclear cells: characterization of novel tachykinin receptor antagonists. *FEBS Letters*, v.399(3), p.321-5, 1996.
- DHABHAR, F. S. Stress-induced enhancement of cell-mediated immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences* , v.840, p.359-72, 1998.
- DO MONTE, F. H.; CANTERAS, N. S.; FERNANDES, D.; ASSREUY, J.; CAROBREZ, A. P. New perspectives on beta-adrenergic mediation of innate and learned fear responses to predator odor. *The Journal of Neuroscience*, v.28(49), p.13296-302, 2008.
- DONAHUE, R. J.; MUSCHAMP, J. W.; RUSSO, S. J.; NESTLER, E. J.; CARLEZON, W. A. JR. Effects of striatal Δ FosB overexpression and ketamine on social defeat stress-induced anhedonia in mice. *Biological Psychiatry*, pii:S0006-3223(14)00004-3, 2014.
- DONNER, J.; HAAPAKOSKI, R.; EZER, S.; MELÉN, E.; PIRKOLA, S.; GRATACÒS, M. Assessment of the neuropeptide S system in anxiety disorders. *Biological Psychiatry*, v.68(5), p.474-83, 2010.
- DUZZIONI, M.; CALIXTO, A. V.; DUARTE, F. S.; DE LIMA, T. C. Modulation of anxiety in rats evaluated in the elevated T-

maze: evidence of the relationship between substance P and diazepam. Behavior Brain Research, v.187(1), p.140-5, 2008.

EBNER, K.; MUIGG, P.; SINGEWALD, G.; SINGEWALD, N. Substance P in stress and anxiety: NK-1 receptor antagonism interacts with key brain areas of the stress circuitry. . Annals of New York Academy of Science, v.1144, p.61–73, 2008.

EBNER, K.; RUPNIAK, N. M.; SARIA, A.; SINGEWALD, N. Substance P in the medial amygdala: emotional stress-sensitive release and modulation of anxiety-related behavior in rats. Proceedings of the National Academy of Science of USA, v.101(12), p.4280-5, 2004.

EVANS, D. L.; LYNCH, K. G.; BENTON, .; DUBÉ, B.; GETTES, D. R.; TUSTIN, N. B.; LAI, J. P.; METZGER, D.; DOUGLAS, S. D. Selective serotonin reuptake inhibitor and substance P antagonist enhancement of natural killer cell innate immunity in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome. Biological Psychiatry. v.63(9), p899-905, 2008.

FAISSNER,, A.; PYKA, M.; GEISLER, M.; SOBIK,, T.; FRISCHKNECHT, R.; GUNDELFINGER, E. D.; SEIDENBECHER, C. Contributions of astrocytes to synapse formation and maturation – potential functions of the perisynaptic extracellular matrix. Brain Research Reviews, v.63, p.26–38, 2010.

FANSELOW, M. S.; DONG, H. W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? Neuron, .v.65(1), p.7-19, 2010.

FEDER, A.; NESTLER, E. J.; CHARNEY, D. Psychobiology and molecular genetics of resilience. Nature Reviews Neuroscience, v.10, p.446-457, 2009.

FRANCIS ,F.; KOULAKOFF, A.; BOUCHER, D.; CHAFEY, P.; SCHAAR, B., VINET, M. C.; FRIOCOURT, G.;

- MCDONNELL, N.; REINER, O.; KAHN, A.; MCCONNELL, S. K.; BERWALD-NETTER, Y.; DENOULET, P.; CHELLY, J. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*, v.23, p.247-256, 1999.
- FRIES, G. R.; MAGALHÃES, P. V. S. A pesquisa básica na Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul Revista de Psiquiatria Rio Grande do Sul, v.32(2), p.33-34, 2010.
- FUJIOKA, A.; FUJIOKA, T.; ISHIDA, Y.; MAEKAWA, T.; NAKAMURA, S. Differential effects of prenatal stress on the morphological maturation of hippocampal neurons. *Neuroscience*, v.141(2), p.907-15, 2006..
- GAVIOLI, E. C.; CANTERAS, N. S.; DE LIMA, T. C. Anxiogenic-like effect induced by substance P injected into the lateral septal nucleus. *Neuroreport*, v.10(16), p.3399-403, 1999.
- GERACIOTI, T. D. JR.; CARPENTER, L. L.; OWENS, M. J.; BAKER, D. G.; EKHATOR, N. N.; HORN, P. S.; STRAWN, J. R.; SANACORA, G.; KINKEAD, B.; PRICE, L. H.; NEMEROFF, C. B. Elevated cerebrospinal fluid substance p concentrations in posttraumatic stress disorder and major depression. *The American Journal of Psychiatry*, v.163(4), p.637-43, 2006.
- GOLDEN, S. A.; COVINGTON, H. E.; BERTON, O.; RUSSO, S. J. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nature Protocol*, v. 6(8), p.1183–1191, 2011.
- GOSWAMI, S.; RODRÍGUEZ-SIERRA, O.; CASCARDI, M.; PARÉ, D. Animal models of post-traumatic stress disorder: face validity. *Frontiers in neuroscience*, v.7, p.1-14, 2013.
- GOULD, E.; MCEWEN, B. S.; TANAPAT, P.; GALEA, L. A.; FUCHS, E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *The Journal of Neuroscience*, v.17, p.2492–2498, 1997.

- GOURLEY, S. L.; SWANSON, A. M.; KOLESKE, A. J. Corticosteroid-induced neural remodeling predicts behavioral vulnerability and resilience. *Journal of Neuroscience*, v.33(7), p.3107-12, 2013.
- GRIEBEL, G. Is there a future for neuropeptide receptor ligands in the treatment of anxiety disorders?. *Pharmacology & Therapeutics*, v.82, p.1–61, 1999.
- GRIEBEL, G.; HOLSBOER, F. Neuropeptide receptor ligands as drugs for psychiatric diseases: the end of the beginning? *Nature Reviews: Drug Discovery*, v.11(6), p.462-78, 2012.
- GUARD, S.; WATSON, S. P. Neurokinin receptor types: classification and membrane signalling mechanisms. *Neurochemistry International*, v.18, p.149-165, 1991.
- HALASZ, J.; TOTH, M.; MIKICS, E.; HRABOVSKY, E.; BARSY, B.; BARSVARI, B.; HALLER, J. The effect of neurokinin1 receptor blockade on territorial aggression and in a model of violent aggression. *Biological Psychiatry*, v.63(3), p.271-8, 2008.
- HAMMAMIEH, R.; CHAKRABORTY, N.; DE LIMA, T. C.; MEYERHOFF, J.; GAUTAM, A.; MUHIE, S.; D'ARPA, P.; LUMLEY, L.; CARROLL, E.; JETT, M. Murine model of repeated exposures to conspecific trained aggressors simulates features of post-traumatic stress disorder. *Behavioral Brain Res*, v.235(1), p.55-66, 2012.
- HARRISON, S.; GEPPETTI, P. Substance P. *The International Journal Biochemistry & Cell Biology*, v.33, p.555–576, 2001.
- HAUGER, R. L.; OLIVARES-REYES, J. A.; DAUTZENBERG, F. M.; LOHR, J. B.; BRAUN, S.; OAKLEY, R. H. Molecular and cell signaling targets for PTSD pathophysiology and pharmacotherapy. *Neuropharmacology*, v.62(2), p.705-14, 2012.
- HEIMER, L.; VAN HOESEN, G. W. The limbic lobe and its output channels: implications for emotional functions and adaptive

behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Review*. v.30(2), p.126-47, 2006.

HILL, M. N.; MCLAUGHLIN, R. J.; MORRISH, A. C.; VIAU, V.; FLORESCO, S. B.; HILLARD, C. J.; GORZALKA, B. B. Suppression of amygdalar endocannabinoid signaling by stress contributes to activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuropsychopharmacology*, v.34(13), p.2733-45, 2009.

HOLMES, A.; HEILIG, M.; RUPNIAK, N. M.; STECKLER, T.; GRIEBEL, G. Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, v.24(11), p.580-8, 2003.

HOSCHL, C.; HAJEK, T. Hippocampal damage mediated by corticosteroids - a neuropsychiatric research challenge. *European Archives of Psychiatry and Neurological Sciences*, v.2, p.81–88, 2001.

HUANG, G. B.; ZHAO, T.; MUNA, S. S.; BAGALKOT, T. R.; JIN, H. M.; CHAE, H. J.; CHUNG, Y. C. Effects of chronic social defeat stress on behaviour, endoplasmic reticulum proteins and choline acetyltransferase in adolescent mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, v.16(7), p.1635-47, 2013

HUHMANN, K. L.; BUNNELL, B. N.; MOUGEY, E. H.; MEYERHOFF, J. L. Effects of social conflict on POMC-derived peptides and glucocorticoids in male golden hamsters. *Physiology & Behavior*, v.47(5), p.949-56, 1990.

HURLEY, L. L.; TIZABI, Y. Neuroinflammation, neurodegeneration, and depression. *Neurotoxicity Research*, v.23(2), p.131-44, 2013.

ÍÑIGUEZ, S. D.; RIGGS, L. M.; NIETO, S. J.; DAYRIT, G.; ZAMORA, N. N.; SHAWHAN, K. L.; CRUZ, B.; WARREN, B. L. Social defeat stress induces a depression-like phenotype in adolescent male c57BL/6 mice. *Stress*, v.17(3), p.247-55, 2014.

- JAUREGUI-HUERTA, F.; RUVALCABA-DELGADILLO, Y.; GONZALEZ-CASTAÑEDA, R.; GARCIA-ESTRADA, J.; GONZALEZ-PEREZ, O.; LUQUIN, S. Responses of glial cells to stress and glucocorticoids. *Current Immunology Reviews*, v.6(3), p.195, 2010.
- JAVIDI, H.; YADOLLAHIE, M. Post-traumatic Stress Disorder. *The International Journal of Occupational Environmental Medicine*, v.3(1), p.2-9, 2012.
- JESSOP, D. S. Stimulatory and inhibitory regulators of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.13(4), p.491-501, 1999.
- JIANG, W.; ZHANG, Y.; XIAO, L.; VAN CLEEMPUT, J.; JI, S. P.; BAI, G.; ZHANG, X. Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *The Journal of Clinical Investigation*, v.115(11), p.3104-16, 2005.
- JOËLS M. Corticosteroid effects in the brain: U-shape it. *Trends in Pharmacological Sciences*, v.27(5), p.244-50, 2006.
- JOËLS M. Impact of glucocorticoids on brain function: relevance for mood disorders. *Psychoneuroendocrinology*, v.36(3), p.406-14, 2011.
- KAPLAN, G. B.; VASTERLING, J. J.; VEDAK, P. C. Brain-derived neurotrophic factor in traumatic brain injury, post-traumatic stress disorder, and their comorbid conditions: role in pathogenesis and treatment. *Behavioural Pharmacology*, v.21(5-6), p.427-37, 2010.
- KEENEY, A.; JESSOP, D. S.; HARBUZ, M. S.; MARSDEN, C. A.; HOGG, S.; BLACKBURN-MUNRO, R. E. Differential effects of acute and chronic social defeat stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and hippocampal serotonin release in mice. *Journal of Neuroendocrinology*, v.18(5), p.330-8, 2006.

- KESSLER, R. C.; CHIU, W. T.; DEMLER, O.; MERIKANGAS, K. R.; WALTERS, E. E. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Archives of General Psychiatry*, v. 62(6), p.617-27, 2005.
- KIM, J. B.; JU, J. Y.; KIM, J. H.; KIM, T. Y.; YANG, B. H.; LEE, Y. S.; SON, H. Dexamethasone inhibits proliferation of adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro. *Brain Research*, v.1027(1-2), p.1-10, 2004.
- KOMATSUZAKI, Y.; MURAKAMI, G.; TSURUGIZAWA, T.; MUKAI, H.; TANABE, N.; MITSUHASHI, K.; KAWATA, M.; KIMOTO, T.; OOISHI, Y.; KAWATO, S. Rapid spinogenesis of pyramidal neurons induced by activation of glucocorticoid receptors in adult male rat hippocampus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.335, p.1002–1007, 2005.
- KOOLHAAS, J. M.; BARTOLOMUCCI, A.; BUWALDA, B.; DE BOER, S. F.; FLÜGGE, G.; KORTE, S. M.; MEERLO, P.; MURISON, R.; OLIVIER, B.; PALANZA, P.; RICHTER-LEVIN, G.; SGOIFO, A.; STEIMER, T.; STIEDL, O.; VAN DIJK, G.; WÖHR, M.; FUCHS, E. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, v.35(5), p.1291-301, 2011.
- KOON, H. W.; POTHOUKAKIS, C. Immunomodulatory properties of substance P: the gastrointestinal system as a model. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1088, p.23-40, 2006.
- KORMOS, V.; GASZNER, B. Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans. *Neuropeptides*, v.47(6), p.401-19, 2013.
- KREUTZBERG, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences*, v.19(8), p.312-8, 1996.
- KRUK, M. R.; HALÁSZ, J.; MEELIS, W.; HALLER, J. Fast positive feedback between the adrenocortical stress response and a

brain mechanism involved in aggressive behavior. *Behavioural Neuroscience*, v.118, p.1062–1070, 2005.

KUDRYAVTSEVA, N. N. A sensory contact model for the study of aggressive and submissive behavior in male mice. *Aggressive Behavior*, v.17, p.285–291, 1991.

KUDRYAVTSEVA, N. N. Experience of defeat decreases the behavioural reactivity to conspecifics in the partition test. *Behavioral Processes*, v.32(3), p.297-304, 1994.

KUNG, J. C.; CHEN, T. C.; SHYU, B. C.; HSIAO, S.; HUANG, A. C. Anxiety- and depressive-like responses and c-fos activity in preproenkephalin knockout mice: oversensitivity hypothesis of enkephalin deficit-induced posttraumatic stress disorder. *Journal of Biomedical Science*, v.17, p.29, 2010.

LAZARCZYK, M.; MATYJA, E.; LIPKOWSKI, A. Substance P and its receptors -- a potential target for novel medicines in malignant brain tumour therapies (mini-review). *Folia Neuropathologica*, v.45(3), p.99-107, 2007.

LEEMAN, S. E.; FERGUSON, S. L. Substance P: An historical perspective. *Neuropeptides*, v.34, p.249–254, 2000.

LEUNER, B.; GOULD, E. Structural plasticity and hippocampal function. *Annual Review of Psychology*, v. 61, p.111-40, 2010.

LEVINE, A. B.; LEVINE, L.; LEVINE, T. B. Posttraumatic stress disorder and cardiometabolic disease. *Cardiology*, v.127(1), p.1-19, 2014.

LIBERZON, I.; KHAN, D.; YOUNG, E. A. Animal models of posttraumatic stress disorders. In: STECKLER, T.; KALIN, N. H.; REUL, J. M. H. M. (Eds.) *Handbook of Stress and the Brain*, cap. 3.6, v.15, p.359-385, Elsevier, 2005.

LIBERZON, I.; LÓPEZ, J. F.; FLAGEL, S. B.; VÁZQUEZ, D. M.; YOUNG, E. A. Differential regulation of hippocampal glucocorticoid receptors mRNA and fast feedback: relevance

to post-traumatic stress disorder. Journal of Neuroendocrinology, v.11(1), p.11-7, 1999 .

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. Psychopharmacology, v.92(2), p.180-5, 1987.

LITTLE, A.R.; O'CALLAGHA, J. P. Astrogliosis in the adult and developing CNS: is there a role for proinflammatory cytokines? Neurotoxicology, v.22(5), p.607-18, 2001.

LIU, B.; HONG, J.-S. Role of Microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v.304(1), p.1-7, 2003.

LIU, R. J.; AGHAJANIAN, G. K. Stress blunts serotonin- and hypocretin-evoked EPSCs in prefrontal cortex: role of corticosterone-mediated apical dendritic atrophy. Proceedings of the National Academy of Science of USA, v.105, p.359-364, 2008.

LOPES, A. P.; MACEDO, T. F.; COUTINHO, E. S.; FIGUEIRA, I.; VENTURA, P. R. Systematic review of the efficacy of cognitive-behavior therapy related treatments for victims of natural disasters: a worldwide problem. PLoS One, v.9(10), p.e109013, 2014.

LUMLEY, L.A.; SIPOS, M. L.; CHARLES, R. C.; MEVERHOFF, J. L. Social stress effects on territorial marking and ultrasonic vocalizations in mice. Physiology & Behavior, v.67(5), p.769-75, 1999.

MALENDOWICZ, L. K.; MARKOWSKA, A. Neuromedins and their involvement in the regulation of growth, structure and function of the adrenal cortex. Histology and Histopathology, v.9(3), p.591-601, 1994.

MARIN, M. T.; CRUZ, F. C.; PLANETA, C. S. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior,

- corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiology & Behavior*, v.90(1), p.29-35, 2007.
- MARTINEZ, M.; CALVO-TORRENT, A.; HERBERT, J. Mapping brain response to social stress in rodents with c-fos expression: a review. *Stress*, v.5(1), p.3-13, 2002.
- MATHEW, S. J.; VYTHILINGAM, M.; MURROUGH, J. W.; ZARATE, C. A. JR.; FEDER, A.; LUCKENBAUGH, D. A.; KINKEAD, B.; PARIDES, M. K.; TRIST, D. G.; BANI, M. S.; BETTICA, P. U.; RATTI, E. M.; CHARNEY, D. S. A selective neurokinin-1 receptor antagonist in chronic PTSD: a randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept trial. *European Neuropsychopharmacology*, v.21(3), p.221-9, 2011.
- MAYER, J. L.; KLUMPERS, L.; MASLAM, S.; DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; LUCASSEN, P. J. Brief treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone normalises the corticosterone-induced reduction of adult hippocampal neurogenesis. *Journal of Neuroendocrinology*, v.18(8), p.629-31, 2006.
- MCDUGALL, S. J.; WIDDOP, R. E.; LAWRENCE, A. J. Medial prefrontal cortical integration of psychological stress in rats. *European Journal of Neuroscience*, v.20(9), p.2430-40, 2004.
- MCEWEN, B. S. Stress and hippocampal plasticity. *Annual of Review Neuroscience*, v.22, p.105-22, 1999.
- MCLAUGHLIN, J. P.; LI, S.; VALDEZ, J.; CHAVKIN, T, A.; CHAVKIN, C. Social defeat stress-induced behavioral responses are mediated by the endogenous kappa opioid system. *Neuropsychopharmacology*, v.31(6), p.1241-8, 2006.
- MICHELSON, D.; HARGREAVES, R.; ALEXANDER, R.; CEESAY, P.; HIETALA J.; LINES, C.; REINES, S. Lack of efficacy of L-759274, a novel neurokinin 1 (substance P) receptor antagonist, for the treatment of generalized anxiety disorder.

The Internacional Journal of Neuropsychopharmacology,
v.16, p.1–11, 2013.

MIRESCU, C.; GOULD, E.; Stress and adult neurogenesis.
Hippocampus, v.16(3), p.233-8, 2006.

MITRA, R.; SAPOLSKY, R. M. Acute corticosterone treatment is
sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic
hypertrophy. Proceedings of the National Academy of
Sciences USA. v.105(14), p.5573-8, 2008.

MIZOGUCHI, K.; ISHIGE, A.; ABURADA, M.; TABIRA, T. Chronic
stress attenuates glucocorticoid negative feedback:
involvement of the prefrontal cortex and hippocampus.
Neuroscience, v.119(3), p.887-97, 2003.

MUÑOZ, M.; COVEÑAS, R. Involvement of substance P and the NK-
1 receptor in human pathology. Amino Acids, 2014.

NAJJAR, D. M.; PEARLMAN, K.; ALPER, A.; NAJJAR, A..
DEVINSKY, O.. Neuroinflammation and psychiatric illness.
Journal of Neuroinflammation, v.10, p. 43, 2013.

NAKAYA, Y.; KANEKO, T.; SHIGEMOTO, R.; NAKANISHI, S.;
MIZUNO, N. Immunohistochemical localization of substance
P receptor in the central nervous system of the adult rat.
Journal of Comparative Neurology, v.347, p.249-274, 1994.

NEDERGAARD, M.; RANSOM, B.; GOLDMAN, S. A. New roles for
astrocytes: redefining the functional architecture of the brain.
Trends Neuroscience, v.26(10), p.523-30, 2003.

NESTLER, E. J. Molecular mechanisms of drug addiction. Journal
Neuroscience, v.12(7), p.2439-50, 2002.

NEWPORT, J.; NEMEROFF, C. Neurobiology of posttraumatic
stress disorder. Current Opinion in Neurobiology, v.10, p.
211-218, 2000.

- OKUDA, H.; TATSUMI, K.; MAKINODAN, M.; YAMAUCHI, T.; KISHIMOTO, T.; WANAKA, A. Environmental enrichment stimulates progenitor cell proliferation in the amygdala. *Journal of Neuroscience Res*, v.87(16), p.3546-53, 2009.
- OLSON, V. G.; ROCKETT, H. R. REH, R.; REDILA, V. A.; TRAN, P. M.; VENKOV, H. A.; DEFINO, M. C.; HAGUE, C.; PESKIND, E. R.; SZOT, P.; RASKIND, M. A. The role of norepinephrine in differential response to stress in an animal model of posttraumatic stress disorder. *Biological Psychiatry*, v.70(5) p.441-8, 2011.
- OTSUKA, M.; YOSHIOKA, K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiology Review*, v.73(2), p.229-308, 1993.
- PANKSEPP, J.; BURGDORF, J.; BEINFELD, M. C.; KROES, R. A.; MOSKAL, J. R. Brain regional neuropeptide changes resulting from social defeat. *Behavioural Neuroscience*, v.121(6), p.1364-71, 2007.
- PATKI, G.; ATROOZ, F.; ALKADHI, I.; SOLANKI, N.; SALIM, S. High aggression in rats is associated with elevated stress, anxiety-like behavior, and altered catecholamine content in the brain. *Neuroscience Letters*, v.584, p.308-13, 2014.
- PERVANIDOU, P.; CHROUSOS, G. P. Neuroendocrinology of post-traumatic stress disorder. *Progress in Brain Research*, v.182, p.149-60, 2010.
- PHILLIPS, A. C.; CARROLL, D.; DER, G. Negative life events and symptoms of depression and anxiety: Stress causation and/or stress generation. *Anxiety Stress Coping*. 2015. DOI:10.1080/10615806.2015.1005078
- PHILLIPS, L. J.; MCGORRY, P. D.; GARNER, B.; THOMPSON, K. N.; PANTELIS, C.; WOOD, S. J.; BERGER, G. Stress, the hippocampus and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for the development of psychotic disorders. *The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry* 40(9), p.725-41, 2006.

- PIZARRO, J. M.; LUMLEY, L. A.; MEDINA, W.; ROBISON, C. L.; CHANG, W. E.; ALAGAPPAN, A.; BAH, M. J.; DAWOOD, M. Y.; SHAH, J. D.; MARK, B.; KENDALL, N.; SMITH, M. A.; SAVIOLAKIS, G. A.; MEYERHOFF, J. L. Acute social defeat reduces neurotrophin expression in brain cortical and subcortical areas in mice. *Brain Research*, v1025(1-2), p.10-20, 2004.
- PROTOPODESCU, X.; PAN, H.; TUESCHER, O.; CLOITRE, M.; GOLDSTEIN, M.; ENGELIEN, W.; EPSTEIN, J.; YANG, Y.; GORMAN, J.; LEDOUX, J.; SILBERSWEIG, D.; STERN, E. Differential time courses and specificity of amygdala activity in posttraumatic stress disorder subjects and normal control subjects. *Biological Psychiatry*, v.57(5), p.464-73, 2005.
- RABASA, C.; MUÑOZ-ABELLÁN, C.; DAVIU, N.; NADAL, R.; ARMARIO, A. Repeated exposure to immobilization or two different footshock intensities reveals differential adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Physiology & Behavior*, v.103(2), p.125-33, 2011.
- RAFFA, R. B. Possible role(s) of neurokinins in CNS development and neurodegenerative or other disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Review*, v.22(6), p.789-813, 1998.
- RANSOHOFF, R. M.; PERRY, V. H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annual Review of Immunology*, v.27, p.119–145, 2009.
- ROBINSON, J. E.; FISH, E. W.; KROUSE, M. C.; THORSELL, A.; HEILIG, M.; MALANGA, C. J. Potentiation of brain stimulation reward by morphine: effects of neurokinin-1 receptor antagonism. *Psychopharmacology*, v.220(1), p.215-24 2012.
- RODGERS, R. J.; COLE, J.C. Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors. *Physiology & Behavior*, v.53(2), p.383-8, 1993.
- RUAN, L.; LAU, B. W.; WANG, J.; HUANG, L.; ZHUGE, Q.; WANG, B.; JIN, K.; SO, K. F⁷. Neurogenesis in neurological and

psychiatric diseases and brain injury: from bench to bedside.
Progress in Neurobiology, v.115, p.116-37, 2014.

RUPNIAK, N. M.; CARLSON, E. C.; HARRISON, T.; OATES, B.; SEWARD, E.; OWEN, S.; DE FELIPE, C.; HUNT, S.; WHEELDON, A. Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK(1) receptors attenuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice. Neuropharmacology, v.39(8), p.1413-21, 2000.

RUPNIAK, N.M.; CARLSON, E.J.; WEBB, J.K.; HARRISON, T.; PORSOULT, R.D.; ROUX, S.; DE FELIPE, C.; HUNT, S.P.; OATES, B.; WHEELDON, A. Comparison of the phenotype of NK1R-/- mice with pharmacological blockade of the substance P (NK1) receptor in assays for antidepressant and anxiolytic drugs. Behavior Pharmacology, v.12, p. 497–508, 2001.

SAKAI, R. R.; TAMASHIRO, K. L. K. Social hierarchy and stress. In. STECKLER, T.; KALIN, N. H.; REUL, J. M. H. M. (Eds.) Handbook of Stress and the Brain, cap. 1.6, v.15, p.113-132, Elsevier, 2005.

SANTARELLI, L.; SAXE, M.; GROSS, C.; SURGET, A.; BATTAGLIA, F.; DULAWA, S.; WEISSTAUB, N.; LEE, J.; DUMAN, R.; ARANCIO, O.; BELZUNG, C.; HEN, R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. Science, v.301(5634), p.805-9, 2003.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L.; MUNCK, A. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. Endocrine Review, v.21, p.55–89, 2000.

SCHESTATSKY, S.; SHANSIS, F.; CEITLIN, L. H.; ABREU, P. B. S.; HAUCK S. Historical evolution of the concept of posttraumatic stress disorder. Revista Brasileira de Psiquiatria, v.25(Supl I):8-11, 2003.

- SCHMUED, L. C.; HOPKINS, K. J. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Research*, v.874(2), p.123-30, 2000.
- SCHOENFELD, T. J.; GOULD, E.. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. *Experimental Neurology*, v.233, p.12–21, 2012.
- SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, v.138, p.32, 1936.
- SHIN, L. M.; RAUCH, S. L.; PITMAN, R. K. Amygdala, medial prefrontal cortex, and hippocampal function in PTSD. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1071, p.67-79, 2006.
- SIEGFRIED, B.; FRISCHKNECHT, H. R.; WASER, P. G. Defeat, learned submissiveness, and analgesia in mice: effect of genotype. *Behavioral Neural Biology*, v.42(1), p.91-7, 1984.
- SILVA, T. P. Alterações comportamentais, neuroquímicas e neuroimunológicas induzidas por lesão estriatal com 6-OHDA. 2012. 126p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- SINGEWALD, N.; CHICCHI, G. G.; THURNER, C. C.; TSAO, K. L.; SPETEA, M.; SCHMIDHAMMER, H.; SREEPATHI, H. K.; FERRAGUTI, F.; SINGEWALD, G. M.; EBNER, K.. Modulation of basal and stress-induced amygdaloid substance P release by the potent and selective NK1 receptor antagonist L-822429. *Journal Neurochemistry*, v.106(6), p.2476-88, 2008.
- STARKMAN, M.N.; GEBARSKI, S.S.; BERENT, S.; SCHTEINGART, D.E. Hippocampal formation volume, memory dysfunction, and cortisol levels in patients with Cushing's syndrome. *Biological Psychiatry*, v.32(9), p.756-65, 1992.
- STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening

- antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, v.85(3), p.367-70, 1985.
- SURI, D.; VAIDYA, V. A. Glucocorticoid regulation of brain-derived neurotrophic factor: relevance to hippocampal structural and functional plasticity. *Neuroscience*, v.239, p.196-213, 2013.
- TASKER, J. G.; OLIET, S.H.; BAINS, J. S.; BROWN, C. H.; STERN, J. E. Glial regulation of neuronal function: from synapse to systems physiology. *Journal of Neuroendocrinology*, v.24(4), p.566-76, 2012.
- TEIXEIRA, R. M.; DUARTE, F. S.; DE LIMA, T. C. Behavioral and immunological effects of substance P in female and male mice. *Pharmacology, Biochemical and Behaviour*, v.79(1), p.1-9, 2004.
- TEIXEIRA, R. M.; SANTOS, A.R.S.; RIBEIRO, S.J. ; CALIXTO, J.B.; ERA, G.A.; DE LIMA, T.C.M. Effects of central administration of tachykinin receptor agonists and antagonists on plus-maze behavior in mice. *European Journal of Pharmacology*, v.311, p.7–14, 1996.
- TEODORO, F. C.; TRONCO, JÚNIOR, M. F.; ZAMPRONIO, A. R.; MARTINI, A. C.; RAE, G. A.; CHICHORRO, J. G. Peripheral substance P and neurokinin-1 receptors have a role in inflammatory and neuropathic orofacial pain models. *Neuropeptides*, v.47(3), p.199-206, 2013.
- THORNTON, E.; VINK, R. Treatment with a substance P receptor antagonist is neuroprotective in the intrastratial 6-hydroxydopamine model of early Parkinson's disease. *PLoS One*, v.7(4), e34138, 2012.
- TORNATZKY, W.; MICZEK, K. A. Long-term impairment of autonomic circadian rhythms after brief intermittent social stress. *Physiology & Behavior*, v.53(5), p.983-93, 1993.
- TORRENS, Y.; BEAUJOUAN, J. C.; SAFFROY, M.; DAGUET DE MONTETY, M. C., BERGSTRÖM, L.; GLOWINSKI, J. Substance P receptors in primary cultures of cortical

astrocytes from the mouse. Proceedings of the National Academy of Science of USA, v.83(23), p.9216-20, 1986.

TSCHÖPE, C.; JOST, N.; UNGER, T.; CULMAN, J. Central cardiovascular and behavioral effects of carboxy- and amino-terminal fragments of substance P in conscious rats. Brain Research, v.690, p.15–24, 1995.

TYE, S.; VAN VOORHEES, E.; HU, C.; LINEBERRY, T. Preclinical Perspectives on Posttraumatic Stress Disorder Criteria in DSM-5. Harvard Review Psychiatry, v.23(1), p.51-8, 2015.

VAN DER HART MG, CZECH B, DE BIURRUN G, MICHAELIS T, WATANABE T, NATT O.; FRAHM, J.; FUCHS, E. Substance P receptor antagonist and clomipramine prevent stress-induced alterations in cerebral metabolites, cytogenesis in the dentate gyrus and hippocampal volume. Molecular Psychiatry, v.7, p.933–941, 2002.

VAN PRAAG, H.; SCHINDER, A. F.; CHRISTIE, B. R.; TONI, N.; PALMER, T. D.; GAGE, F. H. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. Nature, v.415, p.1030-1034, 2002.

VAN-DIJKEN, H. H.; DE-GOEIJ, D. C.; SUTANTO, W.; MOS, J.; DE-KLOET, E. R.; TILDERS, F. J. Short inescapable stress produces long-lasting changes in the brain–pituitary–adrenal axis of adult male rats. Neuroendocrinology, v.58, p.57–64, 1993.

VARGAS, D. L.; NASCIMBENE, C.; KRISHNAN, C.; ZIMMERMAN, A. W.; PARDO, C. A. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. Annals of Neurology, v.57(1), p.67-81, 2005.

VARTY, G. B.; COHEN-WILLIAMS, M. E.; MORGAN, C. A.; PYLAK, U.; DUFFY, R. A.; LACHOWICZ, J. E.; CAREY, G. J.; COFFIN, V. L. The gerbil elevated plus-maze II: anxiolytic-like effects of selective neurokinin NK1 receptor antagonists. Neuropsychopharmacology, v.27(3), p.371-9, 2002.

- VENZALA, E.; GARCIA-GARCIA, A. L.; ELIZADE, N.; DELAGRANGE, P.; TORDERA, R. M. Chronic social defeat stress model: behavioral features, antidepressant action, and interaction with biological risk factors. *Psychopharmacology*, v.224(2), p.313-325, 2012.
- VITALE, G.; FILAFERRO, M.; RUGGIERI, V.; PENNELLA, S.; FRIGERI, C.; RIZZI, A.; GUERRINI, R.; CALÒ, G. Anxiolytic-like effect of neuropeptide S in the rat defensive burying. *Peptides*, v.29(12), p.2286-91, 2008.
- VON ZASTROW, M. Endocytosis and downregulation of G protein-coupled receptors. *Parkinsonism & Related Disorders*, v.7(3), p.265-271, 2001.
- WALSH, D. T.; WEG, V. B.; WILLIAMS, T. J.; NOURSHARGH, S. Substance P-induced inflammatory responses in guinea-pig skin: the effect of specific NK1 receptor antagonists and the role of endogenous mediators. *British Journal of Pharmacology*, v.114(7), p.1343-50, 1995.
- WALSH, K.; NUGENT, N.; KOTTE, A.; AMSTADTER, A. B.; WANG, S.; GUILLE, C.; ACIERNO, R.; KILPATRICK, D. G.; RESNICK, H. S. Cortisol at the emergency room rape visit as a predictor of PTSD and depression symptoms over time. *Psychoneuroendocrinology*, v.38(11), p.2520-8, 2013.
- WILLNER, P.; MUSCAT, R.; PAPP, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v.16, p. 525-534, 1992.
- WOOLLEY, C.S.; GOULD, E.; MCEWEN, B.S. Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons, *Brain Research*, v.531, p. 225 – 231, 1990.
- XIA, M.; ABAZYAN, S.; JOUROUKHIN, Y.; PLETNIKOV, M. Behavioral sequelae of astrocyte dysfunction: focus on

animal models of schizophrenia. Schizophrenia Research, pii: S0920-9964(14)00639-2, 2014.

YEHUDA, R.; GILLES, R. E. L.; SOUTHWICK, S. M.; LOWY, M. T.; MASON, J. W. Hypothalamic-pituitary-adrenal dysfunction in posttraumatic stress disorder. Biologic Psychiatry, v.30(10), p.1031-48, 1991.

YEHUDA, R.; MORRIS, A.; LABINSKY, E.; ZEMELMAN, S.; SCHMEIDLER, J. Ten-year follow-up study of cortisol levels in aging holocaust survivors with and without PTSD. Journal of Traumatic Stress, v.20(5), p.757-61, 2007.

YU, I.T.; LEE, S.H.; LEE, Y.S. SON, H. Differential effects of corticosterone and dexamethasone on hippocampal neurogenesis in vitro. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.317, p.484 – 490, 2004.

YU, T.; GUO, M.; GARZA, J.; RENDON, S.; SUN, X. L.; ZHANG, W.; LU, X. Y. Cognitive and neural correlates of depression-like behaviour in socially defeated mice: an animal model of depression with cognitive dysfunction. The International Journal of Neuropsychopharmacology, v.14(3), p.303-17, 2011.

ZATZICK, D.; DONOVAN, D.; DUNN, C.; RUSSO, J.; WANG, J.; JURKOVICH, G.; RIVARA, F.; WHITESIDE, L.; RIES, R.; GENTILELLO, L. Substance use and posttraumatic stress disorder symptoms in trauma center patients receiving mandated alcohol screening and brief intervention Journal of Substance Abuse Treatment, v.43(4), p.410-7, 2012.

ZHANG, D.; HU, X.; QIAN, L.; O'CALLAGHAN, J. O.; HONG, J-S. Astrogliosis in CNS Pathologies: Is There A Role for Microglia? Molecular Neurobiology, v.41, p.232–241, 2010.

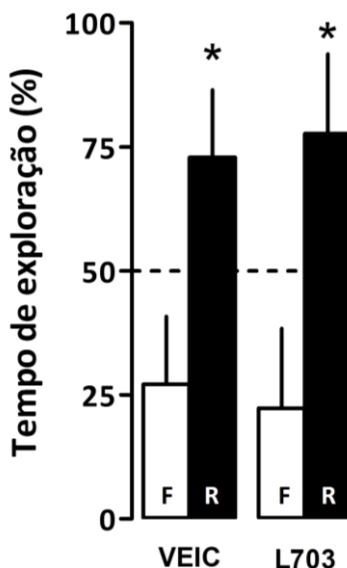


Figura 1. Avaliação do efeito *per se* do antagonista do receptor NK1 (L-703, 606) sobre a memória de animais C57BL/6. Os animais foram tratados com veículo (DMSO 10%) ou antagonista do receptor NK1 (L-703, 606) na dose de 10 mg/kg, via intraperitoneal, 30 min antes do teste de realocação de objetos. O gráfico representa o tempo de exploração (%) no teste de realocação de objetos. VEIC= veículo; L703= antagonista do receptor NK1; F= familiar; R= realocado. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. ($n=6-7$ animais por grupo). * $p \leq 0,05$; quando comparado ao objeto familiar (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni).

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00545

Título

Investigação da influência de fatores ambientais, comportamentais e neurobiológicos em um modelo experimental de transtorno de estresse pós-traumático

Data de Entrada

23/05/2011

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

02/12/2011

Considerações

Ofício nº 208/CEUA/PRPE/2011

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Thereza Christina Monteiro de Lima, Departamento de Farmacologia - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos para a utilização de quarenta (Swiss) mais duzentos e oitenta e quatro (C57BL/6) camundongos.

- Procedência do animal: Swiss:BIC-UFSC / C57BL/6; biotério do Lab. Neurofarmacologia BIO 0025.

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)
Data 08/03/2016

Data 08/12/2011

Parecer(es):



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE

Office for the
Institutional Animal
Care and Use Committee

Northwestern University
750 N. Lake Shore Drive
Suite 400
Chicago, Illinois 60611

anuc@northwestern.edu
Phone 312-503-9339
Fax 312-503-9112



NORTHWESTERN
UNIVERSITY

February 26, 2014

William L. Klein
Department of Neurobiology
2205 Tech Drive, Hogan 4-150/160
Evanston Campus

Protocol: 2014-3406
Title: A Novel, Nanoparticle-based Molecular MRI Probe for Early Alzheimer's
Diagnostics

Approved Animal Numbers/Species: 599 Mice
Funding Source: NIH (R21 AG045637)

The Northwestern University Animal Care and Use Committee (NUACUC) approved the use of animals on the ASP referenced above for the three year period 2/26/2014 through 2/25/2017.

Northwestern University has an Animal Welfare Assurance on file with the Office of Laboratory Animal Welfare (A3283-01). Northwestern University conducts its reviews in accordance with United States Public Health Service (USPHS) regulations and applicable federal and local laws. The composition of the NUACUC meets the requirements of the USPHS policy and the Animal Welfare Act Regulations.

For the Committee,

A handwritten signature in cursive script that reads "C.J. Heckman".

C.J. Heckman, PhD
Chair, IACUC

/mv

cc: CCM